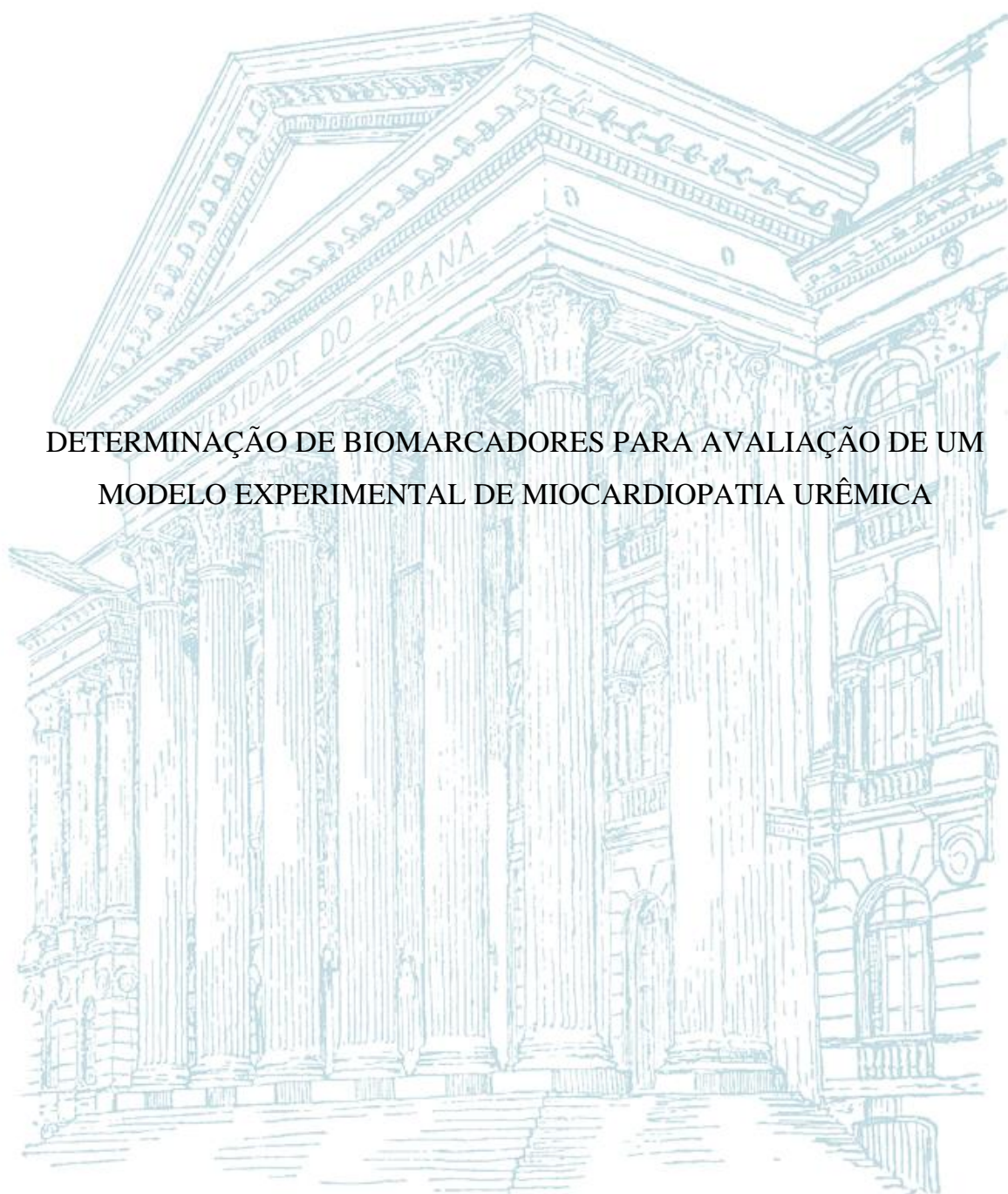


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURA MATTANA DIONÍSIO

DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE UM  
MODELO EXPERIMENTAL DE MIOCARDIOPATIA URÊMICA



CURITIBA

2015

LAURA MATTANA DIONÍSIO

DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE UM  
MODELO EXPERIMENTAL DE MIOCARDIOPATIA URÊMICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Co Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Aline Borsato Hauser

CURITIBA

2015

Dionísio, Laura Mattana

Determinação de biomarcadores para avaliação de um modelo experimental de miocardiopatia urêmica / Laura Mattana Dionísio – Curitiba, 2015.

81 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Coorientadora: Professora Dra. Aline Borsato Hauser

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Doença renal crônica. 2. Síndrome cardiorrenal. 3. Troponina. 4. Interleucina 6. 5. NT-proBNP. I. Rego, Fabiane Gomes de Moraes. II. Hauser, Aline Borsato. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.61

# **TERMO DE APROVAÇÃO**

**LAURA MATTANA DIONÍSIO**

Título: **"DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DA MIOCARDIOPATIA URÊMICA EXPERIMENTAL"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.




Profª. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego  
Orientadora



Profª. Dra. Aline Borsato Hauser  
Co-orientadora



Profª. Dra. Andrea Emilia Marques Stinghen  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Fellype de Carvalho Barreto  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Curitiba, 11 de dezembro de 2015.

## **Agradecimentos**

Eu agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho, e pelo fornecimento da bolsa.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR pelo apoio financeiro prestado, e pela infraestrutura que foi disponibilizada.

Eu agradeço à minha família, pelo apoio, paciência e incentivo sempre prestados, permitindo que a realização desse trabalho fosse possível.

Ao meu namorado Giusepe, pela paciência e por toda a sua ajuda para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha co orientadora, Professora Aline Borsato Hauser pela orientação, paciência e todo o acompanhamento prestado.

À Professora Fabiane Gomes de Moraes Rego por sua contribuição como professora orientadora.

Agradeço ao Professor Railson Henneberg pelo apoio, incentivo e sua importante ajuda para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Escola, e amigos da Pós-Graduação, pela amizade e apoio durante o mestrado.

Ao Professor Roberto Pecoits-Filho por sua importante contribuição para a elaboração e realização deste projeto.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR e à Prof<sup>a</sup> Aline Borsato Hauser, pela realização das cirurgias nos animais e obtenção das amostras.

# **TERMO DE APROVAÇÃO**

**LAURA MATTANA DIONÍSIO**

**Título: "DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DA MIOCARDIOPATIA URÊMICA EXPERIMENTAL"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



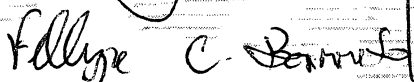
Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego  
Orientadora



Profa. Dra. Aline Borsato Hauser  
Co-orientadora



Profa. Dra. Andrea Emilia Marques Stinghen  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Fellype de Carvalho Barreto  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Curitiba, 11 de dezembro de 2015.

Agradeço às alunas de Iniciação Científica Franciele Robes e Caroline Gribner por sua importante atuação neste projeto, realizando as análises histológicas aqui mencionadas.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Márcia Olandoski pelo auxílio prestado para a análise estatística.

## RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é uma patologia complexa que afeta a estrutura e a função dos rins. Atualmente esta acomete cerca de 15% da população mundial. Eventos cardiovasculares são apontados como a principal causa de morte em indivíduos com DRC. A síndrome cardiorrenal, desordem fisiopatológica ainda não completamente compreendida, consiste num envolvimento interdependente entre coração e rins, em que a disfunção aguda ou crônica de um órgão pode induzir que o mesmo ocorra no outro. Assim, faz-se necessária, a investigação e o aprimoramento de tecnologias e marcadores para a avaliação precoce e monitoramento dos danos ao sistema cardiovascular na condição da DRC. O presente estudo teve por objetivo elucidar aspectos da fisiopatogenia da síndrome cardiorrenal por meio da investigação de biomarcadores cardíacos e de inflamação na doença renal crônica experimental. Foram utilizados, como modelo de DRC, ratos Wistar machos divididos em dois grupos: SHAM (controle normal) e CKD (modelo de DRC), submetidos à cirurgia de nefrectomia 5/6. Foram coletadas amostras de sangue dos animais nos tempos basal (B), 4 (4S) e 8 (8S) semanas após as cirurgias. A medida dos níveis séricos de troponina cardíaca (TnI), foi utilizada como marcador de injúria miocárdica, e o amino terminal do peptídeo natriurético do tipo B (NT-proBNP) foi usado para expressar o estresse à parede cardíaca. Como marcador de processo inflamatório, foi utilizado a interleucina 6 (IL-6). Foi observado aumento nos níveis de TnI na quarta e oitava semana no grupo CKD, indicando o desenvolvimento de injúria miocárdica secundária à DRC. Os níveis de NT-proBNP permaneceram inalterados entre os grupos. Os níveis IL-6 não se apresentaram aumentados. O desenvolvimento de processo inflamatório associado à injúria miocárdica caracteriza um dos conectores cardiorrenais presentes na síndrome cardiorrenal, sugerindo o desenvolvimento desta no grupo CKD. Os biomarcadores TnI e IL-6 apresentam potencial promissor para sua aplicabilidade no monitoramento das consequências cardiovasculares da DRC, porém estudos adicionais quanto ao seu uso clínico ainda são necessários.

Palavras-chave: Doença renal crônica; Síndrome Cardiorrenal; Troponina; Interleucina 6; NT-proBNP; Nefrectomia de 5/6.



## **ABSTRACT**

Chronic kidney disease (CKD) is a complex pathology, which affects renal structure and function. Nowadays, this disease affects around of 15% of worldwide population. Cardiovascular diseases are the main cause of death in CKD patients. Cardio renal Syndrome, a physiopathological disorder that is not completely understood, e consists in an interdependent relationship between heart and kidneys, where the acute or chronic dysfunction in one organ can induce the same in the other organ. Thus, this makes necessary the investigation and improvement of technologies and markers of cardiovascular damage on the onset of chronic kidney disease. This study aimed to improve the comprehension of the mechanisms involved in the cardio renal syndrome pathogenesis by the analysis of cardiac and inflammatory biomarkers in an experimental model o CKD. As a CKD animal model, were used Wistar rats, in two different groups: SHAM (normal control) and CKD (CKD model) that underwent 5/6 nephrectomy surgeries. Blood samples were collected at the times basal (B),4 and 8 weeks after de surgeries. The serum levels of cardiac troponin I (TnI) were used as myocardial injury marker, and the amino terminal of the brain natriuretic peptide (NT-proBNP was used for express the cardiac wall stretching. Interleukin -6 (IL-6) was used as a marker for inflammatory processes. It was showed increased levels of TnI at the times of 4 and 8 weeks in the CKD group, suggesting the development of myocardial injury secondary to CKD. The NT-proBNP levels remained unchanged between the two groups. IL-6 levels were not increased. The development of an inflammatory process linked to myocardial injury characterizes one of the cardio renal connectors present in cardio renal syndrome, suggesting that this condition was present in the CKD group. The IL-6 and TnI biomarkers showed a promising potential for its applicability for the screening of the cardiovascular consequences of CKD, however, additional studies focusing in its clinical use are still in need.

**Key words:** Chronic Kidney Disease; Cardio renal syndrome; Troponin; Interleukin-6; NT-proBN; 5/6 nephrectomy.

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1** - Secção coronal de um rim humano, mostrando cálices renais, seio renal, pelve, hilo, ureter, córtex e medula.

**Figura 2** - Classificação prognóstica para a doença renal crônica (DRC).

**Figura 3** - Desenho esquemático do proBNP mostrando sua clivagem enzimática em BNP e NT-proBNP.

**Figura 4** - Procedimento cirúrgico de nefrectomia de 5/6 - Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR.

**Figura 5** - Infarto renal subtotal de rim esquerdo - Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR.

**Figura 6** - Coleta de sangue por punção caudal – Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR.

**Figura 7** - Microplaca de ELISA para NT-proBNP.

**Figura 8** - Comparação das concentrações de uréia nos tempos basal (B),

**Figura 9** - Comparação das concentrações de potássio nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas, entre os grupos SHAM e CKD.

**Figura 10** - Comparação das concentrações de troponina I (TnI) nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas, entre os grupos SHAM e CKD.

**Figura 11**– Comparação das concentrações de NT-proBNP nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas, entre os grupos SHAM e CKD.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Principais características dos tipos de SCR..

**Tabela 2** - Comparação entre níveis de uréia nos momentos B, 4S e 8S no grupo CKD, através do teste Tukey.

**Tabela 3** - Comparação entre níveis de uréia nos momentos B, 4S e 8S no grupo CKD, através do teste de Tukey.

**Tabela 4** - Comparação entre níveis de Potássio nos momentos B, 4S e 8S no grupo CKD, através do teste de Tukey.

**Tabela 5** - Comparação entre níveis de TnI nos momentos B, 4S e 8S no grupo CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

**Tabela 6** - Comparação entre os níveis de TnI dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

**Tabela 7** - Comparação entre níveis de NT-proBNP nos momentos B, 4S e 8S nos grupos SHAM e CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

**Tabela 8** - Comparação entre os níveis de NT-proBNP dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

**Tabela 9** - Comparação entre níveis de IL-6 nos momentos B, 4S e 8S nos grupos SHAM e CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

**Tabela 10** - Comparação entre os níveis de IL-6 dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

**Tabela 11** - Comparação dos níveis de IL-6 nos grupos SHAM e CKD entre os momentos B, 4S e 8S pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**cTnI** : Troponina Cardíaca I

**cysC** : Cistatina C

**DCV**: Doença cardiovascular

**DRC** : Doença Renal Crônica

**ELISA**: *Enzyme linked immunosorbent assay*

**IL-6** : Interleucina 6

**KDIGO**: *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

**NT- pro BNP**: Amino terminal do peptídeo natriurético do tipo B

**PCR** – proteína C reativa

**SBN** : Sociedade Brasileira de Nefrologia

**SCR** : Síndrome Cardiorrenal

**TFG** : Taxa de filtração glomerular

**TNF- $\alpha$**  : Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2 OBJETIVOS</b>	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
3.1 Anatomia e Fisiologia renal – Aspectos gerais	14
3.2 Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia, Fatores de Risco e Comorbidades	16
3.4 Doença Cardiovascular na Doença Renal Crônica	21
3.5 Inflamação na Doença Renal Crônica	22
3.5.1 Interleucina 6 (IL-6) como Marcador Inflamatório	24
3.6 Síndrome cardiorenal (SCR) e Conexão cardiorenal	25
3.7 Marcadores Bioquímicos na Miocardiopatia	28
3.7.1 BNP e NT- proBNP	28
3.7.2 Troponinas	33
3.8 Modelo animal de DRC	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
4.1 Submissão ao Comitê de Ética de uso de Animais em Pesquisa e Desenvolvimento do Modelo Animal	39
4.2 Modelo Animal	39
4.3 Obtenção de amostras para a pesquisa dos Biomarcadores	41
4.4 Caracterização do Modelo Animal e Análise Bioquímica	42
4.5 Análise de Biomarcadores	43
4.5.1 Dosagem do NT-proBNP	43
4.5.2 Dosagem de Troponina I	44
4.5.3 Dosagem de IL-6	44
4.6 Análise estatística	44
<b>5 RESULTADOS</b>	46
5.1 Análise Bioquímica	46
5.1.1 Ureia	46
5.1.2 Potássio	47
5.2 Análise de Biomarcadores	49
5.2.1 Troponina I	49
5.2.2 NT-proBNP	51
5.2.3 IL-6	53
<b>6 DISCUSSÃO</b>	56
<b>7 CONCLUSÕES</b>	65
<b>REFERÊNCIAS</b>	66
<b>ANEXO I</b>	79

## 1 INTRODUÇÃO

A Doença renal crônica (DRC) é um conjunto heterogêneo de desordens que afetam a estrutura e função dos rins. A variação da expressão desta doença relaciona-se com a sua patogenia, severidade e taxa de progressão. A definição de DRC baseia-se na presença de dano renal e redução da função renal, como por exemplo, redução da taxa de filtração glomerular (TFG) (LEVEY & CORESH, 2012).

Eventos cardiovasculares apresentam-se como a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com DRC (ELLIOTT *et al*, 2014). Há uma importante correlação entre o prejuízo da função renal, caracterizado pela redução da taxa de filtração glomerular, e um risco aumentado de eventos cardiovasculares e morte neste grupo de pacientes (PERAZELLA *et al*, 2006).

A síndrome cardiorrenal consiste num envolvimento interdependente entre coração e rins, a qual se caracteriza por sobrecarga de volume sanguíneo e resistência à diurese, com envolvimento posterior de outros sistemas, além do cardiovascular e renal. Embora a patogenia desta síndrome não esteja completamente elucidada, esta se baseia na conexão entre rim e coração, a qual envolve equilíbrio entre óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, sistema nervoso simpático, eixo renina angiotensina aldosterona e mediadores inflamatórios, em que o estresse oxidativo apresenta-se como fator de considerável relevância (MAHAPATRA *et al*, 2009).

A presença de um processo inflamatório crônico na DRC está relacionada a diversos fatores, como a disfunção da barreira intestinal, hipervolemia, hipertensão, retenção de toxinas urêmicas, além de fatores relacionados à diálise (VAZIRI, 2012).

A interleucina 6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, a qual exerce variadas funções no organismo, apresenta-se como um importante marcador de processo inflamatório, capaz de prever mortalidade associada ou não a doenças cardiovasculares em pacientes em diálise (ZHANG *et al*, 2013).

O complexo das proteínas troponinas exerce papel chave no processo de contração muscular cardíaca. A determinação de isoformas de TnI e TnT específicas do tecido muscular cardíaco, tem sido usada como auxiliar no diagnóstico de patologias que envolvem necrose e injúria aos cardiomiócitos (KATRUKHA, 2013). O peptídeo natriurético do tipo B (BNP) é um hormônio peptídico cardíaco produzido pelos ventrículos. O principal estímulo para a síntese deste peptídeo é a distensão dos cardiomiócitos, sendo assim, a produção deste hormônio em resposta ao stress à parede cardíaca constitui a base para ser utilizado como marcador de doença cardíaca. A sua fração biologicamente inativa, NT- proBNP pode ser medida através de imunoensaios em amostras de sangue humano e de animais (HALL, 2004; HEMALATHA *et al*, 2006).

Portanto, faz-se necessária a investigação de marcadores para a avaliação precoce e monitoramento dos danos ao sistema cardiovascular na condição da DRC. Este projeto pretende investigar o uso dos biomarcadores cardíacos NT- proBNP (amino terminal do peptídeo natriurético do tipo B) e troponina cardíaca I (cTnI) além do biomarcador inflamatório interleucina 6 (IL-6) no estudo da miocardiopatia urêmica em um modelo experimental de DRC. Tais análises têm por intuito elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da síndrome cardiorrenal, com enfoque na possibilidade do uso destes marcadores como alternativas de avaliação, monitoramento, prognóstico e diagnóstico das patologias cardiovasculares no contexto da DRC.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Elucidar aspectos da fisiopatogenia da síndrome cardiorenal por meio da investigação de biomarcadores cardíacos e de inflamação na doença renal crônica experimental.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar metodologias adequadas para a detecção e quantificação dos marcadores NT- pro BNP, troponina I (cTnI) e Interleucina 6 (IL6) em amostras de soro de rato;
- Realizar a determinação sérica dos marcadores cardíacos NT- proBNP (amino terminal do peptídeo natriurético do tipo B) e Troponina I (cTnI) na miocardiopatia urêmica experimental nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas (8S);
- Realizar a determinação sérica do marcador inflamatório interleucina 6 (IL-6) na miocardiopatia urêmica experimental nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas (8S);
- Relacionar os dados obtidos pela medida da expressão dos biomarcadores analisados com aspectos teciduais avaliados no miocárdio (imunohistoquímica).



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Anatomia e Fisiologia renal – Aspectos gerais

O aparelho urinário humano consiste num par de rins e ureteres, além de uma bexiga e uretra. Os rins apresentam formato de feijão, pesando, entre 115 e 170g aproximadamente, o que varia entre os indivíduos e entre os gêneros. Cada rim apresenta um polo superior e um inferior. Seu parênquima é dividido em córtex e medula. O rim humano é uma estrutura multilobular, com aproximadamente 14 lobos, os quais apresentam formato cônico, com a base orientada para a cápsula renal e a ponta ao correspondente cálice renal (HALLGRÍMSSON *et al*, 2003).

A figura abaixo apresenta os principais detalhes da estrutura interna macroscópica dos rins:

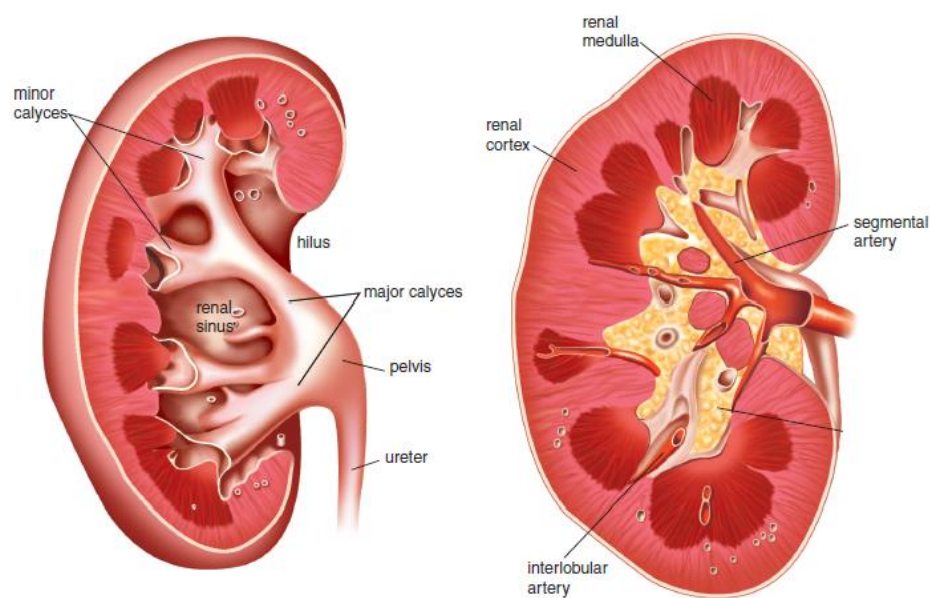


Figura 1- Secção coronal de um rim humano, mostrando cálices renais, seio renal, pelve, hilo, ureter, córtex e medula (HALLGRÍMSSON *et al*, 2003).

Os rins estão localizados na cavidade abdominal posterior, e estão envoltos por uma cápsula fibrosa (HALLGRÍMSSON *et al*, 2003).

As unidades estruturais específicas dos rins são os néfrons. Em ratos, cada rim contém cerca de 30.000 a 35.000 néfrons, enquanto em humanos, este número é estimado em cerca de um milhão. Entretanto, grandes diferenças interindividuais são observadas nestes valores (KRIZ & KAISLING, 2008).

Os néfrons consistem em corpúsculos renais conectados a túbulos contorcidos, os quais drenam para os ductos coletores. Os ductos coletores são formados no córtex renal pela junção de alguns néfrons (KRIZ & KAISLING, 2008).

A principal função dos rins é atuar como um sistema de filtração do sangue e produção de urina, com o intuito de remover resíduos e água em excesso do sangue. Assim, toxinas circulantes são carregadas até os rins através da artéria renal, e chegam às arteríolas aferentes, que dão origem aos glomérulos. Tais estruturas podem ser descritas como os filtros capilares dos rins (CHAWLA & KIMMEL, 2012).

Saindo dos glomérulos, o sangue entra em uma arteríola eferente, preferencialmente a uma vênula. Tal mecanismo atua como um controle da TFG, uma vez que arteríolas têm mais propriedades contráteis, o que permite que um maior controle do fluxo sanguíneo no interior destas (CHAWLA & KIMMEL, 2012).

Elevada pressão sanguínea no glomérulo força a passagem de água, sais e moléculas através de poros na membrana das células endoteliais. Estes extravasam para o espaço circundante, constituído pela membrana basal glomerular e podócitos, os quais fazem parte da delimitação do espaço de Bowman. A cápsula de Bowman envolve o glomérulo e forma o terminal proximal de um néfron. Tais camadas formam uma espécie de barreira seletiva, impedindo que moléculas grandes, como proteínas (>60-70 kDa) passem pelo néfron e consequentemente sejam eliminadas na urina. A porção do filtrado que é coletada pela cápsula de Bowman e que passa pelo túbulo proximal do néfron é chamada de filtrado glomerular. O filtrado glomerular percorre o interior do néfron, onde ocorre a reabsorção de água e sais para os capilares peritubulares. Neste ponto também ocorre a secreção ativa de muitas toxinas e metabólitos de drogas, processo este que se dá entre os capilares

peritubulares e os túbulos renais, para posterior excreção (CHAWLA & KIMMEL, 2012).

O resultado final deste processo é a formação de urina no interior dos ductos coletores. Este processo de ultrafiltração é a TFG, considerada a melhor medida para a avaliação da função renal (CHAWLA & KIMMEL, 2012).

### 3.2 Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia, Fatores de Risco e Comorbidades

A Doença renal crônica (DRC) é um termo geral, usado para definir um conjunto de desordens que afetam a estrutura e função dos rins. O grau de expressão desta doença é variável, o que se relaciona em parte com a causa, severidade e taxa de progressão (LEVEY & CORESH, 2012).

A definição baseia-se na presença de dano renal, o que pode ser caracterizado pela detecção de albuminúria, redução da TFG ( $<60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ) por 3 meses ou mais, independente do diagnóstico clínico (LEVEY & CORESH, 2012). Devido ao papel chave que a TFG representa na fisiopatologia da doença, a DRC pode ser classificada em estágios, de acordo com a gravidade.

A figura abaixo mostra a classificação prognóstica para DRC, de acordo com o KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, 2012) considerando as TFG e albuminúria. A cor azul indica que não há DRC, se não houver outros marcadores que a definem, amarelo indica risco moderado, laranja alto risco e vermelho risco muito alto.

Taxa de Filtração Glomerular (Categorias, descrição e faixas)			Albuminúria (categorias, descrição e faixas)		
			A1	A2	A3
			Normal a levemente aumentada	Moderadamente aumentada	Severamente aumentada
			<30 mg/g	30-300 mg/g	>300 mg/g
<b>G1</b>	Normal ou aumentada	≥ 90			
<b>G2</b>	Levemente diminuída	60-89			
<b>G3a</b>	Levemente a moderadamente diminuída	45-59			
<b>G3b</b>	Moderadamente a severamente diminuída	30-44			
<b>G4</b>	Severamente diminuída	15-29			
<b>G5</b>	Insuficiência Renal	<15			

Figura 2 – Classificação prognóstica para a doença renal crônica (DRC) FONTE: Adaptado de KDIGO (2012).

Atualmente, estima-se que mais de 15% da população mundial adulta seja afetada pela DRC. Estes possuem maior risco de desenvolver hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares, com associada morbidade e mortalidade. Pacientes em estágio final da DRC que estão em diálise possuem uma chance de cerca de 50% em sobreviver por mais três anos. De forma geral, a DRC teve sua incidência aumentada em dez vezes nas últimas três décadas, sendo que pacientes acometidos por esta podem ter redução de até 70% de sua expectativa de vida (TAKASE *et al*, 2014).

A visão epidemiológica da DRC tem passado por mudanças significantes nos últimos 20 anos. Inicialmente esta doença era descrita como uma patologia de incidência relativamente baixa, como doenças glomerulares e nefropatias hereditárias. Atualmente esta afeta uma grande porcentagem da população mundial, e encontra-se relacionada a fenômenos de alta incidência, como idade avançada,

aumento da pressão arterial, diabetes e doença cardiovascular (GOROSTIDI *et al*, 2014).

A DRC é uma comorbidade observada em outras especialidades médicas além da nefrologia, como medicina interna, cuidados primários, cardiologia, geriatria, endocrinologia e clínicas médicas com pacientes com risco de desenvolver DRC, principalmente onde a idade avançada dos pacientes é fator predominante. Pacientes em DRC avançada, que estão cadastrados para transplantes e em diálise são considerados apenas a parte visível do grande problema de saúde pública que esta patologia representa (GOROSTIDI *et al*, 2014).

A prevalência global desta doença está estimada entre 8 e 16%, porém tal valor varia consideravelmente entre países e regiões. A baixa prevalência de progressão para o estágio final da DRC em países menos desenvolvidos é consequência da falta de acesso a cuidados de saúde, enquanto que em outras partes do mundo em que o crescimento econômico é mais evidente, observou-se um rápido crescimento do número de pacientes que estão no estágio final da doença, necessitando de terapia de transplante (JHA *et al*, 2013).

A DRC está geralmente associada com idade avançada, diabetes, hipertensão, obesidade, doença cardiovascular, glomeruloesclerose diabética e nefroesclerose hipertensiva (HOUSMAN & SHROPSHIRE, 2010). Como a idade é reconhecida como um fator de risco para a DRC, a prevalência desta patologia tende a aumentar à medida que a população de idosos aumenta. Além disso, com o aumento da média de idade populacional, é esperada uma maior incidência de hipertensão, diabetes e obesidade, aumentando consequentemente o risco de desenvolver DRC (ELLIOTT, 2012). Além dos fatores apontados acima como causadores de DRC, encontra-se a vasculite primária e secundária, nefrite tubulointersticial, entre outros. Independente do fator que os desencadeou, estes aparentam executar um importante papel na inflamação na DRC, assim, observa-se que pacientes com DRC são tratados de forma inespecífica com agentes imunossupressores e antihipertensivos (TAKASE *et al*, 2014). Em países em desenvolvimento, causas comuns para a DRC também incluem doenças túbulo intersticiais e glomerulares, resultantes de infecções e exposição a drogas e toxinas (LEVEY & CORESH, 2012).

A glomeruloesclerose diabética é caracterizada por um lento aumento da albuminúria, hipertensão e redução progressiva da TFG, progredindo, às vezes, para síndrome nefrótica. A nefroesclerose hipertensiva não apresenta em si marcadores diferentes dos relacionados a dano renal, que a identifique, entretanto altas concentrações de albuminúria podem ocorrer após o estabelecimento de uma reduzida TFG (LEVEY & CORESH, 2012).

### 3.3 Diagnóstico da Doença Renal Crônica

Os sinais que definitivamente caracterizam uma situação de DRC são a redução da TFG e proteinúria persistente por um período superior a 3 meses. A TFG baseia-se na medida da creatinina sérica. Porém, existem diferentes métodos e fórmulas para calculá-la, dependendo da idade do paciente. Medidas isoladas da TFG têm sido associadas com uma superestimação da prevalência da DRC, o que pode colocar em risco a saúde e a qualidade de vida do paciente (DELANAYE & MARIAT, 2013).

A TFG pode ser determinada através de fórmulas que incluem também dados antropométricos em seu cálculo, além do valor da creatinina sérica. Entre as principais e mais utilizadas estão as fórmulas de MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) e de Cockcroft–Gault para a estimação da TFG em adultos, e a equação de Schwartz para crianças (HERGET-ROSENTHAL, *et al*, 2007). No Brasil, têm-se recomendado a fórmula do grupo *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI), a qual é uma variação da fórmula do MDRD. A equação utiliza as mesmas quatro variáveis que a MDRD (creatinina sérica, idade, sexo e raça), porém, apresenta melhor desempenho e previsão de desfechos adversos (MAGACHO *et al*, 2012).

A presença de Albuminúria, constitui o maior indicador da presença de DRC, e têm sido frequentemente associado com o risco de DRC e DCV, em uma escala global. Também é considerado um marcador recente de doença glomerular que

precede o prejuízo da TFG. A presença de albumina na urina foi recentemente incluída como parte do sistema de estadiamento da DRC, e pode indicar a progressão da doença com maior precisão do que a TFG isolada (LAMBERS-HEERSPINK, *et al*, 2010).

Dados de estudos experimentais e clínicos sugerem que a proteinúria apresenta um importante papel na patogênese da progressão da doença (REMUZZI *et al*, 2006), sendo que estudos epidemiológicos indicam haver relação entre aumento da albuminúria, dano renal e mortalidade, em associação ou não à redução da TFG e fatores de risco de doença cardiovascular (JONG & CURHAN, 2006). As variáveis que determinam o risco de complicações na DRC são a TFG, intensidade de albuminúria e outras comorbidades associadas. Uma vez diagnosticada a patologia em um paciente específico, a etiologia desta deve ser avaliada considerando a TFG e albuminúria. Tal sistema permite que seja efetuada a classificação prognóstica dos pacientes em DRC em moderada, de risco e alto risco, considerando como valores de referência, os de pacientes que não estão em DRC (TFG  $>60\text{ml/min/1.73m}^2$  e albuminúria  $<30\text{mg/g}$ ) (GOROSTIDI *et al*, 2014).

O uso da razão albumina/creatinina urinária fornece um bom indicador da função renal, sendo um teste de fácil aplicação e que apresenta uma boa relação custo/benefício (LAMBERS-HEERSPINK, *et al*, 2010).

A cistatina C (cysC) passa para o filtrado glomerular sendo normalmente absorvida completamente pelos túbulos proximais, além de apresentar níveis constantes entre indivíduos de diferentes raças, ou seja, parece ser um excelente marcador da TFG. (CHAE *et al*, 2012). Entretanto, a validação da cysC como marcador de função renal está limitada à alguns estudos em subgrupos de pacientes, assim não apresenta um padrão de referência adequado além de apresentar alto custo (DELANAYE & MARIAT, 2013).

### 3.4 Doença Cardiovascular na Doença Renal Crônica

As taxas de mortalidade por causa cardiovascular em pacientes com DRC apresentam-se muito mais elevadas do que em pacientes não portadores desta patologia. A mortalidade tende a aumentar à medida que a TFG decai, e a DRC progride para seu estágio terminal. As condições de comorbidade desenvolvidas em associação com a DRC tais como doenças cardiovasculares, anemias, distúrbios do metabolismo de cálcio e fósforo, acidose e doença vascular periférica, conduzem à elevada mortalidade nestes pacientes (PERAZELLA & KHAN, 2006).

Em particular, doenças cardiovasculares frequentemente estão associadas à DRC, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade. Assim, terapias que têm como alvo tanto a progressão da DRC como suas complicações cardiovasculares, desenvolvidas com frequência nestes pacientes, são necessários para reduzir a mortalidade em tal situação (PERAZELLA & KHAN, 2006).

O fato de pacientes em DRC, apresentarem um risco aumentado de desenvolver complicações cardiovasculares, corresponde a uma resposta de fatores de risco clássicos, como é o caso da pressão arterial elevada e diabetes. Albuminúria elevada aumenta o risco de complicações cardiovasculares, independente da TFG. De fato, pacientes em DRC apresentam maior risco de mortalidade por doenças cardiovasculares do que de necessitar de tratamento por diálise ou transplante renal (GOROSTIDI *et al*, 2014).

De acordo com a *Spanish Society of Nephrology* (GOROSTIDI *et al*, 2014) considera-se que pacientes em DRC com  $TFG < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$  são considerados em alto risco cardiovascular. A taxa de mortalidade por causa cardiovascular é de cerca de 10 a 20 vezes maior em pacientes em estágio avançado da DRC do que na população geral, considerando estratificação por idade, raça e gênero (GLUBA-BRZÓZKA *et al*, 2014).

Estudos populacionais corroboram com tal dado, acrescentando que a detecção de albuminúria também está associada com um maior risco de morte por complicações cardiovasculares em pacientes em DRC. Pessoas em DRC apresentam



maior risco de desenvolverem um evento cardiovascular do que de progredir para o estágio avançado da doença. Apresentam pior prognóstico, com elevado risco de mortalidade após um infarto agudo do miocárdio, e maior risco de recorrência deste evento, bem como de falência cardíaca, e morte súbita por falência cardíaca. Assim, o manejo dos fatores de risco cardiovasculares, assim como a melhora da pressão arterial e o controle de diabetes, também contribui para a redução da progressão da DRC (KDIGO, 2012).

### 3.5 Inflamação na Doença Renal Crônica

O sistema imune de pacientes em DRC apresenta-se cronicamente ativado, sendo que a inflamação, no estágio avançado da DRC é um problema multifatorial (HAUSER *et al*, 2008). Sinais de ativação do sistema imune e níveis elevados de mediadores inflamatórios podem ser observados nos estágios iniciais da DRC, e estes tendem a aumentar com a progressão da insuficiência renal. Este estado inflamatório crônico apresenta uma ligação importante com algumas complicações da DRC, como a calcificação vascular, aterosclerose acelerada, perda de apetite, resistência à insulina, aumento do catabolismo vascular e anemia (HAUSER *et al*, 2011).

Fatores relacionados ou não à diálise são capazes de promover processo inflamatório na DRC por estimular a síntese ou a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a proteína C reativa, interleucinas 1 e 6, e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Os níveis de NT-proBNP estão diretamente relacionados ao IL-6, o que indica que a inflamação e disfunção endotelial são processos paralelos na DRC em estado avançado (DZIEDZIC, 2014).

O estresse oxidativo e a inflamação sistêmica executam papel chave na progressão da DRC, e suas complicações incluem DCV, caquexia, anemia, entre outras. Estes dois processos apresentam uma ligação importante entre si. Isso acontece devido à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) sensível

a redox, o qual é a principal molécula reguladora de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais são desencadeadores do estresse oxidativo e recrutamento do sistema imune (VAZIRI, 2012).

Alguns fatores têm atuado de forma a contribuir para o estresse oxidativo e a inflamação na DRC. Neste contexto, a disfunção mitocondrial, co-morbididades como diabetes e doenças autoimunes, a ativação do sistema da angiotensina, hipervolemia, hipertensão, dislipidemia, retenção de toxinas urêmicas e metabólitos, e infecções, exercem um papel importante na patogênese do estresse oxidativo e da inflamação associados a esta doença (VAZIRI, 2012).

As toxinas urêmicas consistem num grupo heterogêneo de moléculas, incluindo compostos orgânicos e peptídeos, apresentando um efeito pró-inflamatório. Um exemplo de toxinas urêmicas, responsáveis por efeito pró-inflamatório na DRC são os produtos de glicação avançada (AGES), os quais apresentam-se em níveis aumentados nesta situação em virtude de sua reduzida depuração renal (HAUSER *et al*, 2008).

Além disso, evidenciou-se que o prejuízo da via do fator de transcrição Nrf2, induzido pela DRC tem importante função no processo de desativação dos mecanismos antioxidantes naturais, os quais atuam em resposta à inflamação e o estresse oxidativo (KIM & VAZIRI, 2010).

Fatores iatrogênicos, como a sobrecarga de ferro provocada pelo uso indiscriminado de preparações intravenosas deste composto, interações entre o sangue e a membrana de diálise, e influxo de impurezas provenientes do compartimento do dialisado em membranas de alto fluxo podem desencadear estresse oxidativo e inflamação em pacientes em estado avançado da DRC (VAZIRI, 2012).

Além dos fatores descritos acima, já foi evidenciada uma relação entre a condição de uremia, presente na DRC, e disfunção da barreira intestinal. As junções oclusivas presentes no epitélio intestinal formam uma barreira efetiva contra o influxo de microrganismos, toxinas microbianas, produtos bacterianos, antígenos, enzimas digestivas, produtos de degradação de alimentos e outras substâncias nocivas do lúmen gastrointestinal para o meio externo (VAZIRI, 2012).

Primeiramente, os pacientes urêmicos exibem endotoxemia, na ausência de infecção clínica (RAJ *et al*, 2009). A microbiota do trato gastrointestinal parece ser a principal fonte de endotoxemia em pacientes urêmicos livres de infecção. Assim, a passagem de endotoxinas do lúmen para o sangue indica disfunção da barreira presente na mucosa intestinal. Além disso, estudos evidenciaram a penetração de bactérias da microbiota através da parede intestinal, sendo estas detectadas em linfonodos mesentéricos de ratos urêmicos (ALMEIDA-DUARTE *et al*, 2004).

Algumas situações observadas em pacientes em DRC apresentam-se como importantes fontes de endotoxemia, tais como a uremia, má nutrição induzindo à atrofia da mucosa intestinal, insuficiência cardíaca e edema, levando à disfunção da barreira intestinal (HAUSER *et al*, 2011).

Também há evidências histológicas de inflamação ao longo do trato gastrointestinal, incluindo esofagite, gastrite, colite e duodenite, em pacientes que estão em diálise (VAZIRI *et al*, 1985). Assim, o prejuízo da função da barreira intestinal pode contribuir para a prevalência de inflamação, estresse oxidativo e toxicidade urêmica (RITZ, 2011).

### 3.5.1 Interleucina 6 (IL-6) como Marcador Inflamatório

A IL6 é uma citocina sintetizada por variados tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, em resposta a estímulos como infecções e trauma. Seus sinais são transmitidos através de receptores expressos por uma ampla gama de células alvo (NIBALI *et al*, 2012).

A IL-6 apresenta variadas funções, incluindo o estímulo para a síntese hepática de proteínas de fase aguda, ativação de células endoteliais, aumento da coagulação, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e promoção da proliferação e diferenciação de linfócitos (HARTMAN & FRISHMAN, 2014). A IL-6 é capaz de estimular um grande número de processos biológicos, incluindo a

produção de anticorpos e autoanticorpos, ativação de células T e B, diferenciação celular, hematopoiese, e indução de angiogênese, permeabilidade vascular e diferenciação de osteoclastos (NIBALI *et al*, 2012).

Esta molécula apresenta papel chave no que se refere ao desenvolvimento e progressão da doença arterial coronariana, contribuindo principalmente para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e promoção da migração de células inflamatórias para o sítio da lesão (HARTMAN & FRISHMAN, 2014).

Estudos realizados em pacientes em estágio avançado da DRC relatam que estes apresentaram um aumento significativo dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ , quando comparados ao grupo controle. Tal fato justifica-se pela combinação do aumento da produção sistêmica destas citocinas, associado a uma inflamação subclínica, além da possível degradação diminuída dessas moléculas pelos rins (ROUBICEK *et al*, 2009).

De acordo com Hiramoto *et al* (2012) o aumento nos níveis de IL-6 apresenta uma correlação positiva com o prejuízo da função renal em pacientes com DRC, expresso pela redução da TFG, considerando os ajustes relacionados à idade, sexo, etnia e comorbidades relacionadas à doença.

A IL-6, assim como a proteína C reativa (PCR) apresenta-se como um importante marcador, capaz de prever mortalidade associada ou não a DCV em pacientes dialíticos. O papel chave que estes marcadores representam no prognóstico de pacientes nesta condição pode contribuir para a sua utilidade clínica (ZHANG *et al*, 2013). Além disso, há indícios de que nestes pacientes, o tecido adiposo pode ser uma importante fonte produtora de citocinas pró inflamatórias, como é o caso da IL-6 (ROUBICEK *et al*, 2009).

### 3.6 Síndrome cardiorrenal (SCR) e Conexão cardiorrenal

A Síndrome cardiorrenal (SCR) pode ser definida, de forma geral, como uma desordem fisiopatológica do coração e rins, na qual a disfunção aguda ou crônica de

um órgão pode induzir que o mesmo ocorra no outro. A SCR inclui uma variedade de condições agudas e crônicas, sendo que o primeiro órgão afetado pode tanto ser o coração como os rins (RONCO *et al*, 2008).

Um estudo publicado por Ronco *et al* (2008) propõe uma classificação para a SCR, dividindo-a em 5 tipos conforme a Tabela 2.

Tabela 1- Principais características dos tipos de SCR.

Tipo de SCR	Características
Tipo 1 (SCR aguda)	Rápido prejuízo da função cardíaca, induzindo injúria renal aguda. Evento de ocorrência comum.
Tipo 2	Anormalidades crônicas da função cardíaca provocando doença renal crônica e progressiva.
Tipo 3	Piora da função renal repentina e primária (Ex.: injúria renal aguda, glomerulonefrite). Induz uma disfunção cardíaca aguda
Tipo 4	Condição primária de DRC contribui para prejuízo da função cardíaca. Risco aumentado para eventos cardiovasculares.
Tipo 5	Disfunção cardíaca e renal concomitantes; Mortalidade aumenta com o comprometimento de outros sistemas.

FONTE: RONCO *et al* (2008).

A conexão cardiorrenal se dá porque coração e rins são órgãos altamente vascularizados, e ambos são inervados pelos sistemas simpático e parassimpático. Tais órgãos agem em funções contrárias e complementares para regular a pressão sanguínea, tônus vascular, diurese, natriurese, homeostase intravascular, perfusão tecidual periférica e oxigenação. Estes possuem função endócrina com ações fisiológicas hormonais interdependentes, regulados pelo peptídeo natriurético atrial, um agente vasodilatador secretado pelo coração, e o sistema renina angiotensina aldosterona (MAHAPATRA *et al*, 2009).

Além disso, a vitamina D3, eritropoetina e renalase são todas secretadas pelos rins, sendo capazes de promover sinalização celular e humoral. A disfunção de um dos órgãos pode promover a disfunção do outro. Alterações no eixo renina angiotensina aldosterona, no equilíbrio entre óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, no sistema nervoso simpático e inflamação podem ser apontados como conectores cardiorrenais, os quais estão envolvidos nos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da síndrome cardiorrenal. Tais conectores, quando associados, reduzem a sensibilidade à eritropoetina, e são responsáveis por desencadear a anemia renal, a qual também agrava as condições clínicas da insuficiência cardíaca (MAHAPATRA *et al*, 2009).

Ainda, acredita-se que alguns fatores que são específicos ou estão diretamente relacionados com a DRC como anemia, hipertensão e homeostase anormal de cálcio e fósforo estão fortemente associados com a patogenia das doenças cardiovasculares e morte neste grupo de pacientes (LEKAWANVIJIT & KRUM, 2014).

Os mecanismos que determinam a interligação entre insuficiência cardíaca e disfunção renal não estão completamente elucidados. O prejuízo da função cardíaca provoca redução da perfusão tecidual, assim, afetando adversamente a perfusão renal. Tal mecanismo explica alguns aspectos da síndrome cardiorrenal. Entretanto, mudança no peso corporal e diurese não estão relacionadas de forma significativa com a disfunção renal em pacientes hospitalizados com insuficiência cardíaca. Tal observação indica que a fisiopatologia da disfunção renal, no contexto das doenças cardíacas é muito mais complexa que a simples redução do débito cardíaco (MAHAPATRA *et al*, 2009).

No que se refere ao monitoramento das consequências desta síndrome, nenhum biomarcador isolado permite o diagnóstico precoce e a estratificação de risco para a síndrome cardiorrenal, sendo necessária uma abordagem com variados marcadores. Para isto, sugere-se combinações de marcadores cardíacos, como troponina e NT-proBNP e marcadores de lesão renal, como NGAL, dependendo esta escolha do tipo de dano que se pretende monitorar (KUSTER *et al*, 2013).

### 3.7 Marcadores Bioquímicos na Miocardiopatia

#### 3.7.1 BNP e NT- proBNP

A miocardiopatia é o termo usado para descrever uma patologia induzida pela alteração da estrutura do miocárdio e/ou desenvolvimento de disfunção sistólica ou diastólica na ausência de defeito valvar, hipertensão arterial ou patologias coronarianas (ELLIOTT *et al*, 2008).

A possibilidade de que o coração possui uma função endócrina surgiu cerca de 60 anos atrás, época em que se conhecia o fato de que a dilatação dos átrios cardíacos gera natriurese. Posteriormente foi evidenciado por microscopia eletrônica que havia grânulos intracelulares no interior dos miócitos atriais, com padrão semelhante ao observado em células endócrinas, sustentando a ideia de que o coração possui atividade endócrina. Em experimento publicado por deBold em 1981, foram injetados extratos de miócitos atriais em ratos, e uma rápida natriurese e diurese foi observada. Em estudos posteriores, o fator ativo responsável por tal ação foi chamado de fator natriurético atrial (ANF), e depois modificado para peptídeo natriurético atrial (ANP) (HALL, 2004).

O ANP é um peptídeo composto por 28 aminoácidos, com uma ponte dissulfeto, constituindo uma estrutura em anel (FLYNN *et al*, 1983). Posteriormente, foi identificado, no cérebro de porcos um peptídeo natriurético semelhante ao ANP, o qual foi denominado peptídeo natriurético do tipo B (BNP) (SUDOH *et al*, 1988), o qual compartilha receptores periféricos com o ANP.

O gene humano para o BNP está localizado no cromossomo 1, o qual codifica para um pró hormônio de 108 aminoácidos, o proBNP (HALL, 2004). O BNP é secretado predominantemente pelos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo. Na circulação, a parte biologicamente ativa do hormônio BNP, que é composta por 32 aminoácidos é separada da parte N (amino) - terminal deste, o NT-proBNP, o qual é biologicamente inativo (DZIEDZIC *et al*, 2014). Dados de experimentos realizados in vitro indicam que a enzima furina é responsável pela clivagem do pró-hormônio nestes dois fragmentos, conforme mostrado na Figura 3 (SAWADA *et al*, 1997).

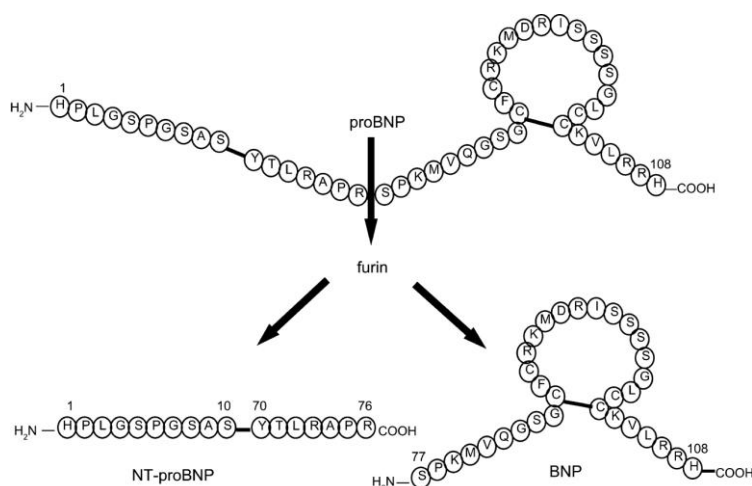


Figura 3 - Desenho esquemático do proBNP mostrando sua clivagem enzimática em BNP e NT-proBNP.

FONTE: HALL (2004).

Os cardiomiócitos constituem a maior fonte de peptídeos relacionados ao BNP na circulação. O principal estímulo para a síntese e secreção de BNP e ANP é o estresse à parede cardíaca. Uma vez que o estresse aumentado à parede cardíaca é um denominador comum em muitas doenças cardíacas, conclui-se que os peptídeos natriuréticos circulantes servem como marcadores bioquímicos destas condições (HALL, 2004).

Há considerável diferença entre os dois peptídeos natriuréticos cardíacos, principalmente no que se refere aos depósitos intracelulares e mecanismos de secreção. O ANP é armazenado nos grânulos atriais, e a distensão atrial é acompanhada de uma rápida liberação dos peptídeos ANP- relacionados. Já o NT-pro BNP é secretado por um mecanismo constitutivo, o que significa que pequenas quantidades são armazenadas em grânulos, e as células que os contêm dependem da ativação do gene do BNP, para promover aumento da secreção deste peptídeo. Entretanto, em comparação ao ANP, a ativação do gene do BNP ocorre mais rapidamente (HALL, 2004).

Em organismos normais, os átrios são a principal fonte dos dois peptídeos. Entretanto, na distensão crônica dos miócitos na insuficiência cardíaca ocorre aumento da produção dos peptídeos natriuréticos pelos ventrículos. Este aumento da expressão de peptídeos natriuréticos parece ser quantitativamente mais importante



em peptídeos relacionados ao BNP do que ao ANP. Assim, pode-se encontrar na literatura, o BNP descrito como um hormônio ventricular (HALL, 2004).

A produção de BNP é maior que a de ANP, especialmente em casos de falência cardíaca. Além disso, a produção de BNP parece estar aumentada em maior extensão que a de ANP, em casos de infarto do miocárdio, possivelmente em consequência aos mecanismos de distensão na área ao redor do local do infarto (SUMIDA *et al*, 1995).

A secreção de BNP é consideravelmente maior na região que ocorreu o infarto do que a que não ocorreu, fato que não é observado no perfil de secreção do ANP. Tais achados indicam que o estresse à parede dos ventrículos, provocado pelo infarto do miocárdio, estimula intensamente a secreção de BNP, sendo que este peptídeo é um marcador de estiramento ventricular mais sensível que o ANP (SUMIDA *et al*, 1995).

Embora a distensão dos cardiomiócitos seja o principal estímulo para a síntese do BNP, a liberação deste também pode ocorrer em situações de isquemia, inflamação e estresse oxidativo (MAHADAVAN *et al*, 2014).

Os efeitos fisiológicos do BNP têm sido estudados pela sua injeção em organismos intactos, expondo células ou órgãos a crescentes concentrações de BNP, ou pelo desenvolvimento de camundongos capazes de super expressar ou não expressar (*knockout*) o gene que codifica para este peptídeo. Tais análises mostram que, assim como o ANP, o BNP se liga a receptores de peptídeos natriuréticos do tipo A, aumentando a produção de GMP cíclico intracelular (SUGA *et al*, 1992). Os efeitos biológicos produzidos pelo BNP incluem diurese, vasodilatação, inibição da produção de renina e aldosterona, e inibição do crescimento de miócitos cardíacos e vasculares (HALL, 2004).

Camundongos que super expressam o gene para o BNP apresentaram hipotensão sistêmica e malformações ósseas (OGAWA *et al*, 1994). Já camundongos *knockout* para o gene do BNP apresentaram fibrose cardíaca, mas sem hipertensão, indicando que o BNP atua em conjunto com o ANP, contribuindo para a homeostase cardiovascular, e atua localmente no miocárdio com possível papel antifibrótico. (TAMURA *et al*, 2000).

O hormônio BNP promove o relaxamento da musculatura lisa vascular, dilata artérias e veias, reduz a pressão sanguínea e a pré carga ventricular, além de inibir a ativação simpática e o eixo renina-angiotensina-aldosterona. Este também aumenta a taxa de filtração glomerular e inibe a reabsorção de sódio pelos rins, promovendo natriurese e diurese (SATO, 2013).

Tanto o BNP como o seu amino terminal (NT-proBNP) são reconhecidos como marcadores de estresse ao miocárdio, e considerados bons marcadores de diagnóstico e prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca. Na família dos peptídeos natriuréticos, o NT- proBNP parece ser o melhor para previsão de desfechos clínicos, e o melhor marcador de sobrecarga de fluido extracelular. Este marcador tornou-se uma importante ferramenta para diagnóstico de disfunção ventricular esquerda e avaliação do risco de mortalidade, independente da função renal, em adultos (DZIEDZIC, 2014).

Entretanto, em pacientes com DRC, o uso deste marcador torna-se confuso devido à sobrecarga de volume concomitante e a excreção renal reduzida em tal situação (DAVID *et al*, 2008). Tanto o ANP como o BNP são removidos da circulação por duas vias: (1) internalização mediada por receptores e metabolismo (primariamente nos rins) e (2) degradação proteolítica por peptidases neutras nos rins, endotélio vascular, pulmões e coração. O BNP apresenta depuração mais lenta em ambas as vias. Consequentemente o tempo de meia vida do ANP é de 3 a 5 minutos, sendo muito mais curto que o do BNP (23 minutos). Já o seu fragmento inativo, o NT- proBNP tem uma meia vida muito mais longa (60-120 minutos), o que reforça a relevância do uso deste parâmetro como uma ferramenta diagnóstica, em preferência ao BNP (FELKER *et al*, 2006).

Ainda no que se refere às aplicações diagnósticas da quantificação dos níveis plasmáticos do NT- proBNP, estudos realizados por David *et al* (2008) indicam que este pode ser usado como um biomarcador para identificar a disfunção ventricular esquerda, em pacientes em estágio avançado da DRC. Além disso, também foi evidenciado o aumento dos níveis deste marcador, em resposta à sobrecarga de volume sanguíneo, em pacientes com DRC.

As concentrações séricas de NT-proBNP podem ser medidas principalmente através de imunoensaio e eletroquimioluminescência (HALL, 2004; DZIEDZIC, 2014; JAFRI *et al*, 2013). Estudos demonstraram que os níveis plasmáticos de NT-proBNP estão elevados e associados ao prejuízo da TFG em pacientes com DRC que estão em diálise. Além disso, o grau de alteração dos níveis circulantes deste peptídeo é dependente da fração de ejeção ventricular esquerda, o que reflete um aumento da sobrecarga de volume no coração, como consequência da expressão do volume associada à TFG reduzida (DZIEDZIC, 2014).

Tanto o BNP como seu amino terminal são estabelecidos como biomarcadores de insuficiência cardíaca, entretanto, a presença concomitante de DRC, altera sua interpretação de maneira significativa. Os níveis plasmáticos destes peptídeos aumentam gradualmente à medida que a função renal piora, e seus níveis estão significativamente aumentados no agravamento da falência cardíaca sistólica, em pacientes em condição de DRC (JAFRI *et al*, 2013).

Estudos realizados por Jafri *et al* (2013) em uma população de pacientes em DRC revelam que os níveis de NT-proBNP apresentam-se muito mais elevados que os de BNP nos pacientes em insuficiência cardíaca. Além disso, através de análises estatísticas indicou-se que o NT-proBNP é melhor que o BNP para o estudo populacional em todos os estágios da DRC. Neste estudo, os níveis plasmáticos de NT-proBNP foram mais afetados pelo declínio da TFG do que os de BNP, e o NT-BNP parece ser um preditor de insuficiência cardíaca na condição de DRC melhor que o BNP.

O NT-proBNP é útil tanto para o diagnóstico como para o prognóstico de insuficiência cardíaca, e é considerado padrão ouro como biomarcador nesta condição (PANAGOPOULOU *et al*, 2013).

Um valor de *cut-off* de 300 pg/mL para o NT-proBNP tem 99% de sensibilidade, 60% de especificidade e 98% de probabilidade de exclusão de falência cardíaca aguda. Este marcador também tem importante valor prognóstico para morte em falência cardíaca crônica, e também prevê mortalidade a curto e longo prazo com suspeita ou confirmação de DCV (PANAGOPOULOU *et al*, 2013).

Níveis elevados de NT-proBNP também podem ser encontrados em diversas condições clínicas que não a insuficiência cardíaca, tais como: doenças valvulares, arritmias, anemias, doenças cardiopulmonares, miocardiopatias, como hipertrofia e miocardiopatias infiltrativas e inflamatórias, e também em algumas condições críticas como queimaduras e sepse bacteriana (BAGGISH *et al*, 2008).

De forma geral, o NT-proBNP é tão útil como o BNP para o prognóstico e avaliação diagnóstica de pacientes em insuficiência cardíaca, independente da função renal. Particularmente, em pacientes em DRC severa o NT-proBNP é um marcador melhor que o BNP, embora os valores ideais de *cut-off* para NT-proBNP variam amplamente baseando-se na função renal (SATO, 2013).

### 3.7.2 Troponinas

Troponinas são componentes estruturais dos filamentos finos, as quais exercem papel regulatório no processo de contração muscular (BIMA *et al*, 2012). O complexo das troponinas consiste em três subunidades: troponina C (TnC) à qual se liga o  $Ca^{++}$ , troponina I (TnI), que inibe a atividade de ATPase do complexo actina-miosina e troponina T (TnT), que interage com a tropomiosina (KATRUKHA, 2013).

As isoformas cTnT e cTnI são específicas para o miocárdio, diferente da TnC, o que torna estes marcadores altamente específicos para diferenciar entre uma injúria muscular cardíaca e outros tipos de lesão muscular. cTnI e cTnT estão distribuídas nos cardiomiócitos entre dois compartimentos (BIMA *et al*, 2012). O componente estrutural do sarcômero corresponde à maior parte, porém o subtipo cTnT também se apresenta como componente citoplasmático, representando 4 a 6 % do total (LEWANDROWSKI *et al*, 2002). Ambos os marcadores apresentam padrões semelhantes de liberação plasmática em situações de dano ao miocárdio. Quando ocorre injúria miocárdica reversível o componente citosólico de troponina é liberado na circulação. O estresse celular prolongado pode provocar danos irreversíveis aos

cardiomiócitos e consequente liberação plasmática tanto da porção citosólica como da estrutural das troponinas (HICKMAN *et al*, 2010).

A liberação do *pool* citosólico de troponina dos cardiomiócitos aparentemente é responsável pela detecção recente de troponina cardíaca após a injúria. Concentrações de troponina cardíaca são semelhantes às de CK-MB se for considerado apenas o *pool* citoplasmático (liberação recente). Assim, a elevada sensibilidade clínica das troponinas cardíacas resulta do fato de que grande parte deste *pool* alcança a circulação após a injúria celular. A liberação subsequente cTn é proveniente do *pool* estrutural, o que em parte justifica a prolongada permanência deste marcador na circulação perante à curta meia vida da proteína, observada após a injeção de formas purificadas em animais (JAFJE & WU, 2012).

Durante o processo de contração muscular, após a ligação da troponina ao cálcio ocorrem mudanças em sua estrutura, as quais permitem que ocorra a interação ATP dependente entre actina e miosina, fazendo com que ocorra então a contração das fibras musculares (KATRUKHA, 2013).

Modificações nas isoformas das troponinas cardíacas, ligações alternativas e modificações pós traducionais do complexo das troponinas permitem o fino ajuste da contração cardíaca. Esta proteína é alvo de alguns fármacos cardiotônicos, usados no tratamento de falência cardíaca (KATRUKHA, 2013).

Determinadas mutações nos genes da troponina podem levar ao desenvolvimento de uma série de miocardiopatias. Além disso, isoformas de TnI e TnT específicas do tecido muscular cardíaco (cTnI e cTnT) têm sido usadas como auxiliares no diagnóstico de patologias que envolvem necrose dos cardiomiócitos, como por exemplo, o infarto agudo do miocárdio (KATRUKHA, 2013).

As isoformas cTnI e cTnT não são detectadas normalmente no sangue de indivíduos saudáveis. Assim, elevações significativas destas normalmente caracterizam uma resposta à necrose do miocárdio. Pacientes com elevação de troponina, mas não de CK-MB podem exibir zonas microscópicas de necrose no miocárdio, o que caracteriza um tipo de lesão chamado de microinfarto (LEWANDROWSKI *et al*, 2002).

Também é observada uma relação quantitativa entre a medida de troponina cardíaca no sangue e o risco de morte em pacientes com síndrome coronariana aguda (LEWANDROWSKI *et al*, 2002).

Ambos os marcadores (cTnT e cTnI) podem ser considerados marcadores bioquímicos cardíacos ideais, uma vez que estes são expressos exclusivamente no tecido cardíaco, estando, portanto, ausentes em outros tecidos. Além disso, estas são liberadas em padrão linear após a injúria, apresentam longo tempo de meia vida (dias) e podem ser medidas através de ferramentas práticas e acessíveis (BIMA *et al*, 2012).

A alta sensibilidade destes marcadores, pode ser explicada por sua elevada concentração no interior dos cardiomiócitos (6mg/g de tecido para cTnI e 10mg/g de tecido para cTnT) especialmente comparada com a concentração de outros marcadores de lesão cardíaca, como é o caso da CK-MB, que se apresenta na concentração de aproximadamente 1,4 mg/g de tecido (BIMA *et al*, 2012).

Um dos mecanismos mais importantes na regulação do funcionamento das proteínas é a sua fosforilação. As subunidades TnT e TnI podem ser fosforiladas por várias quinases, havendo considerável efeito em suas estruturas e propriedades. Danos aos mecanismos de fosforilação das troponinas estão associados com diferentes patologias do músculo cardíaco, o que confirma o papel de tais modificações nas funções do complexo das troponinas (KATRUKHA, 2013).

A isoforma I (cTnI) tem uma cauda pós traducional de 32 aminoácidos em seu amino terminal. Tal sequência apresenta 42% e 45% de diferença com as sequências das outras isoformas, T e C respectivamente, o que tornou possível a geração de anticorpos monoclonais altamente específicos sem reação cruzada com isoformas não cardíacas (BABUIN & JAFFE, 2005).

A medida dos níveis séricos de cTnI é frequentemente usada para determinar a presença de isquemia miocárdica em pacientes hospitalizados com um diagnóstico primário não relacionado à doença cardíaca (TOTA-MAHARAJ *et al*, 2014).

No que se refere à relevância clínica das troponinas no contexto da DRC, as dosagens de biomarcadores específicos do miocárdio (cTnI e cTnT) são apontadas como os testes não invasivos mais importantes para avaliar o impacto da

insuficiência renal sobre o coração (PARSA *et al*, 2012). Elevações na cTnI não associadas à síndrome coronariana aguda são comuns em pacientes com DRC nos estágios 3 a 5, sendo que há um aumento da mortalidade na presença de altas concentrações de cTnI neste grupo de indivíduos (FLORES-SOLÍS & HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, 2014).

Em estudo realizado por Donnino *et al* (2008) em 113 pacientes em estágio avançado da DRC, os quais estavam em diálise e eram assintomáticos para DCV, foram avaliados os níveis séricos de cTnI, sendo que estes não se apresentaram falsamente elevados neste grupo de pacientes. Assim, a determinação da cTnI pode ser usada como um bom marcador de injúria miocárdica na situação de DRC avançada.

Além disso, os níveis elevados de cTnI aparentam ser bons indicadores de injúria miocárdica na insuficiência cardíaca em pacientes com DRC sem síndrome coronariana aguda (CHEN *et al*, 2013). Ainda, o aumento nos níveis de troponinas cardíacas está associado com uma menor fração de ejeção, e a um maior espessamento da parede posterior do ventrículo esquerdo em pacientes com DRC (CHEN *et al*, 2013).

### 3.8 Modelo animal de DRC

O uso de modelos animais de falência renal crônica, principalmente em ratos, tem possibilitado uma melhor compreensão desta patologia. Entretanto, nenhum deles é capaz de reproduzir exatamente as características de tal patologia em um rim humano (CHOW *et al*, 2003).

O termo “modelo animal”, no campo das ciências biomédicas refere-se a uma representação simplificada de um sistema mais complexo, com o intuito de que a informação obtida possa ser transferida para um sistema de maior complexidade. O modelo experimental ideal de uremia deve constituir um ambiente de pesquisa

reprodutível, que seja semelhante à doença renal crônica em humanos, embora haja algumas discrepâncias entre um ambiente criado artificialmente e a fisiopatologia da doença em si. Preferencialmente, os animais devem ser mantidos em uma condição estável de falência renal crônica por períodos relativamente longos, para estudos de longo prazo (CHOW *et al*, 2003).

A Nefrectomia cirúrgica de 5/6 foi a metodologia de escolha para este estudo.

A primeira nefrectomia parcial em humanos foi realizada por Czerny em 1887, em que as cápsulas renais foram removidas da área a ser retirada cirurgicamente. Dois anos mais tarde, a primeira nefrectomia parcial realizada em animais foi feita por Tuffier, que removeu um rim inteiro uma porção do colateral. Nenhuma mudança na eliminação de água ou uréia foi evidenciada. Em seguida, inúmeros experimentos de nefrectomia foram realizados em diversas espécies animais, até que foi desenvolvido um procedimento cirúrgico em duas etapas, o qual ficou conhecido como nefrectomia de 5/6, em que os pólos superior e inferior do rim esquerdo são removidos, permanecendo apenas a porção intermediária do parênquima renal e o hilo renal intactos.

Cerca de duas semanas depois é realizada a segunda etapa, em que o rim esquerdo é totalmente removido (CHOW *et al*, 2003).

Ao longo do tempo, esta técnica foi aos poucos modificada, com o intuito de reduzir a mortalidade dos animais após o procedimento cirúrgico, bem como a perda excessiva de sangue. A remoção parcial do rim esquerdo e total do direito pode ser executada simultaneamente, no mesmo procedimento cirúrgico, para evitar que o animal seja submetido a dois procedimentos em um curto período de tempo. As mudanças estruturais e adaptativas que ocorrem após a redução da massa renal representam o processo patológico (HOSTETTER *et al*, 2001).

Após significativa redução da massa renal e número de néfrons, ocorre hipertrofia na porção de rim remanescente. Esta adaptação caracteriza-se por uma dilatação desproporcional das arteríolas glomerulares aferentes, contribuindo para o aumento do fluxo de plasma néfron-glomérulo (hiperfusão) e hiperfiltração. (HOSTETTER *et al*, 2001). O aumento da sobrecarga de trabalho do pool



remanescente de néfrons normais caracteriza a injúria renal progressiva e a instalação doença renal crônica (CHOW *et al*, 2003).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Submissão ao Comitê de Ética de uso de Animais em Pesquisa e Desenvolvimento do Modelo Animal

O projeto para obtenção das amostras utilizadas neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa envolvendo animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) em dezembro de 2010 em reunião realizada no dia 02/12/2010 sobre número de registro 574 (ANEXO I).

Este projeto é uma parceria entre a UFPR e a PUCPR e foi desenhado para ser realizado em duas partes. A primeira parte foi o desenvolvimento do modelo animal de doença renal e a segunda parte o uso dos soros dos animais para a pesquisa dos biomarcadores.

### 4.2 Modelo Animal

A primeira parte deste estudo foi realizada no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR. Foram utilizados 41 ratos Wistar, machos e adultos, disponibilizados pelo Biotério Central da PUCPR, com peso aproximado de 300 gramas, sendo divididos em dois grupos:

- SHAM (controle): 10 animais
- Urêmico (DRC): 31 animais

Os animais foram primeiramente anestesiados com cloridrato de quetamina (VetanarcolR 50 mL König 80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (AnasedanR 10 mL

Vetbands 15 mg/kg). Os animais do grupo CKD foram submetidos a procedimento cirúrgico de ablação renal ligando-se as artérias renais mediana e posterior do rim esquerdo, assegurando o desenvolvimento de infarto em pelo menos 2/3 do órgão. O rim direito foi removido por nefrectomia total. O grupo SHAM foi submetido à anestesia e apenas à manipulação dos pedículos renais, sem remoção de massa renal ou ligação das artérias.

O anti-inflamatório cetoprofeno (2 a 5mg/kg, via subcutânea, a cada 12 a 24 horas) foi administrado após a cirurgia para analgesia. Após o procedimento, os animais retornaram às suas gaiolas com livre acesso à água e à ração, sendo mantidos a uma temperatura de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sob ciclo noite-dia (12:12 horas) por um período de 4 e 8 semanas, conforme o grupo.



Figura 4 – Procedimento cirúrgico de nefrectomia de 5/6 - Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR.

FONTE: Os autores (2012)

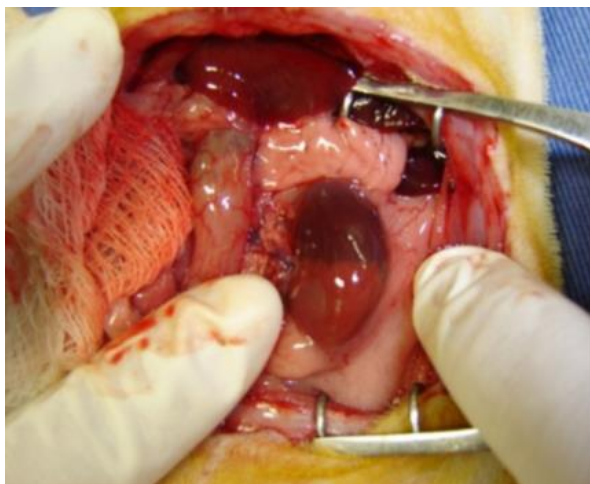


Figura 5 – Infarto renal subtotal de rim esquerdo - Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR.

FONTE: Os autores (2012)

#### 4.3 Obtenção de amostras para a pesquisa dos Biomarcadores

Esta dissertação de mestrado corresponde a segunda parte do estudo e foi realizada no Laboratório Escola do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As coletas de sangue foram realizadas através da punção caudal após anestesia, nos tempos basal, 4 semanas e 8 semanas após cirurgia. As amostras foram centrifugadas para obtenção de soro em frascos livres de endotoxinas, e congeladas à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.



Figura 6 - Coleta de sangue por punção caudal – Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR.

FONTE: Os autores (2012)

#### 4.4 Caracterização do Modelo Animal e Análise Bioquímica

Foram realizadas dosagens de ureia e potássio das amostras obtidas. As dosagens de ureia foram realizadas manualmente com o uso de um kit comercial, pelo método colorimétrico enzimático (Kit Uréia CE por Reação Colorimétrica – Labtest Diagnóstica S. A.). As dosagens de potássio foram realizadas por método automatizado, de eletroquimioluminescência, com o equipamento ARCHITECT ci8200 (Abbott Diagnostics©).

O critério adotado como fator de escolha das amostras que seriam submetidas à análise dos biomarcadores foram os níveis séricos de ureia em qualquer um dos tempos analisados. Para a padronização do grupo CKD foram incluídos soros com níveis séricos superiores a 60 mg/dL. Em relação ao grupo SHAM, foram incluídos soros com valores de ureia inferiores a 60 mg/dL.

## 4.5 Análise de Biomarcadores

### 4.5.1 Dosagem do NT-proBNP

As dosagens do biomarcador NT-proBNP foram realizadas pelo método de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*), do tipo sanduíche, com anticorpos específicos para NT-proBNP de rato, adsorvidos a uma fase sólida, de kit destinado a análises em pesquisa, pronto para uso, disponível comercialmente, de acordo com as instruções do fabricante (Elabscience Biotechnology Co.,Ltd, Beijing).

A leitura da densidade óptica das amostras foi realizada no equipamento *Thermoplate* (Leitora de microplaca- *TP reader*), com filtros de comprimento de onda de 450 nm.

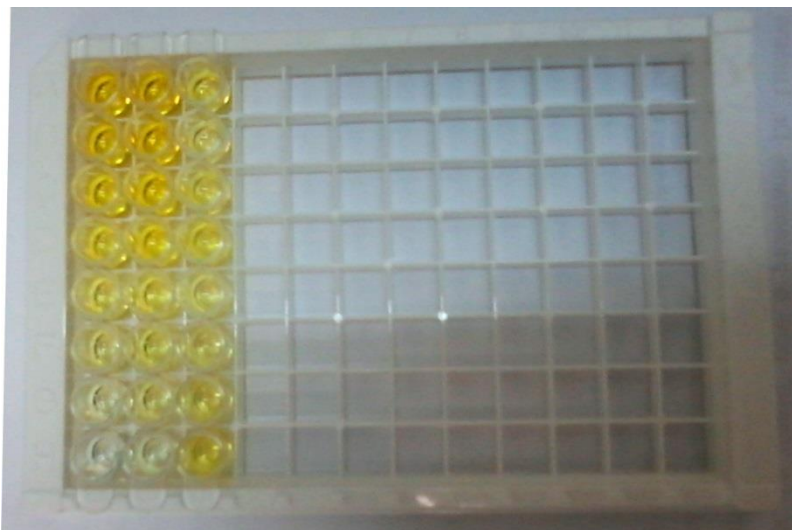


Figura 7 – Microplaca de ELISA para NT-proBNP.  
FONTE: O autor (2015).

#### 4.5.2 Dosagem de Troponina I

As amostras de soro foram primeiramente homogeneizadas, e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. As dosagens do biomarcador Troponina I foram realizadas pela metodologia quimioluminescência, de forma automatizada com o equipamento ARCHITECT ci8200 (Abbott Diagnostics), utilizando o kit de imunoensaio de quimioluminescência com micropartículas *STAT hsTroponin* (Abbott Diagnostics).

#### 4.5.3 Dosagem de IL-6

As dosagens do biomarcador IL-6 foram realizadas pelo método de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*), do tipo sanduíche, com anticorpos específicos para IL-6 de rato, adsorvidos a uma fase sólida, de kit destinado a análises em pesquisa, pronto para uso, disponível comercialmente, de acordo com as instruções do fabricante (BioLegend Inc. San Diego, CA).

A leitura da densidade óptica das amostras foi realizada no equipamento *Thermoplate* (Leitora de microplaca- *TP reader*), com filtros de comprimento de onda de 450 nm.

#### 4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey. Também foram realizados os testes não paramétricos de Friedman e Man Whitney para a análise de biomarcadores. Tais análises foram

executadas com o auxílio do *software* Action® (Versão 2.8) e o *software* IBM SPSS Statistic (Versão 20).

Para os gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 6).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Bioquímica

#### 5.1.1 Ureia

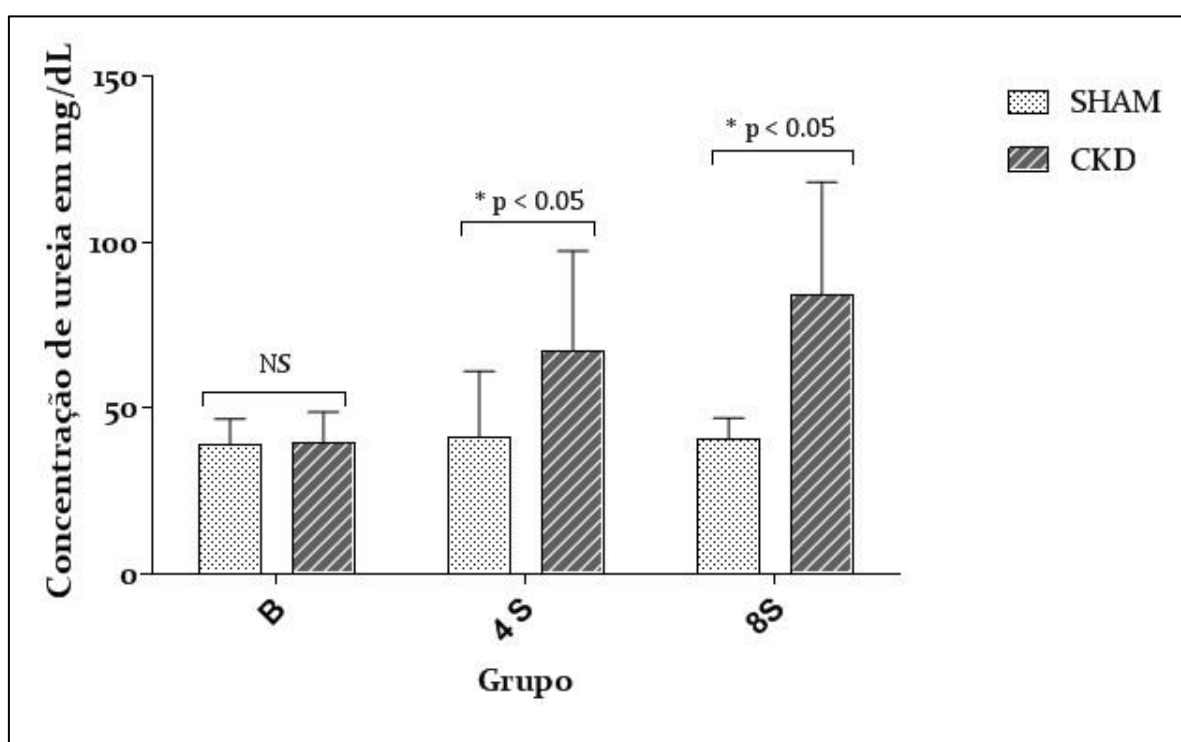


Figura 8 – Comparação das concentrações de ureia nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas (8S), entre os grupos SHAM e CKD.

SHAM B: n= 10; SHAM 4S: n= 10; SHAM 8S: n= 8; CKD B: n=29; CKD 4S: n= 29; CKD 8S= 17.

De acordo com a análise estatística (ANOVA), seguida de teste de Tukey, a um nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) não houve diferença significativa entre as dosagens de ureia entre os grupos CKD e SHAM no tempo basal ( $p = 0,999$ ). Nos tempos 4S e 8S houve aumento significativo ( $p = 0,034$  e  $p = 0,001$ , respectivamente) nos níveis séricos de ureia no CKD em relação ao grupo SHAM.

Tabela 2- Comparação entre os níveis de uréia dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste de Tukey.

<b>Momentos comparados (Uréia)</b>	<b>p-valor (SHAM x CKD)</b>
<b>Uréia B</b>	0,999
<b>Uréia 4S</b>	0,034
<b>Uréia 8S</b>	0,001

Tabela 3- Comparação entre níveis de TnI nos momentos B, 4S e 8S no grupo CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

<b>Momentos comparados (Uréia)</b>	<b>p-valor</b>
<b>B x 4S</b>	0,0002
<b>B x 8S</b>	< 0,0001
<b>4S x 8S</b>	0,3215

### 5.1.2 Potássio

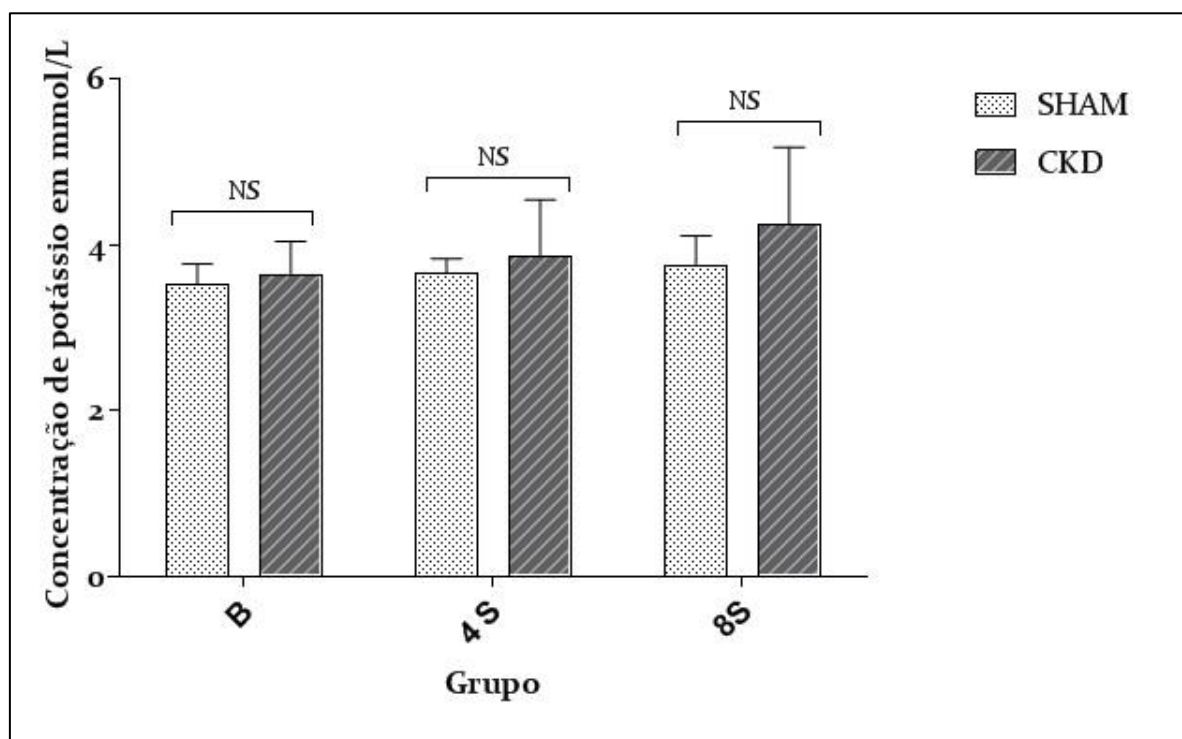


Figura 9 – Comparação das concentrações de potássio nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas, entre os grupos SHAM e CKD.

SHAM B: n= 9; SHAM 4S: n= 9; SHAM 8S: n= 7; CKD B: n= 29; CKD 4S: n= 16; CKD 8S= 6.

De acordo com a análise estatística (ANOVA), seguida de teste de Tukey, a um nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) não houve diferença significativa nas dosagens de potássio entre os grupos CKD e SHAM em nenhum dos tempos analisados. p= 0,994; 4S: p= 0,945; 8S: p= 0,537.

Tabela 4- Comparação entre os níveis de Potássio dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste de Tukey.

<b>Momentos comparados (TnI)</b>	<b>p-valor (SHAM x CKD)</b>
<b>Potássio B</b>	0,994
<b>Potássio 4S</b>	0,945
<b>Potássio 8S</b>	0,537

## 5.2 Análise de Biomarcadores

### 5.2.1 Troponina I

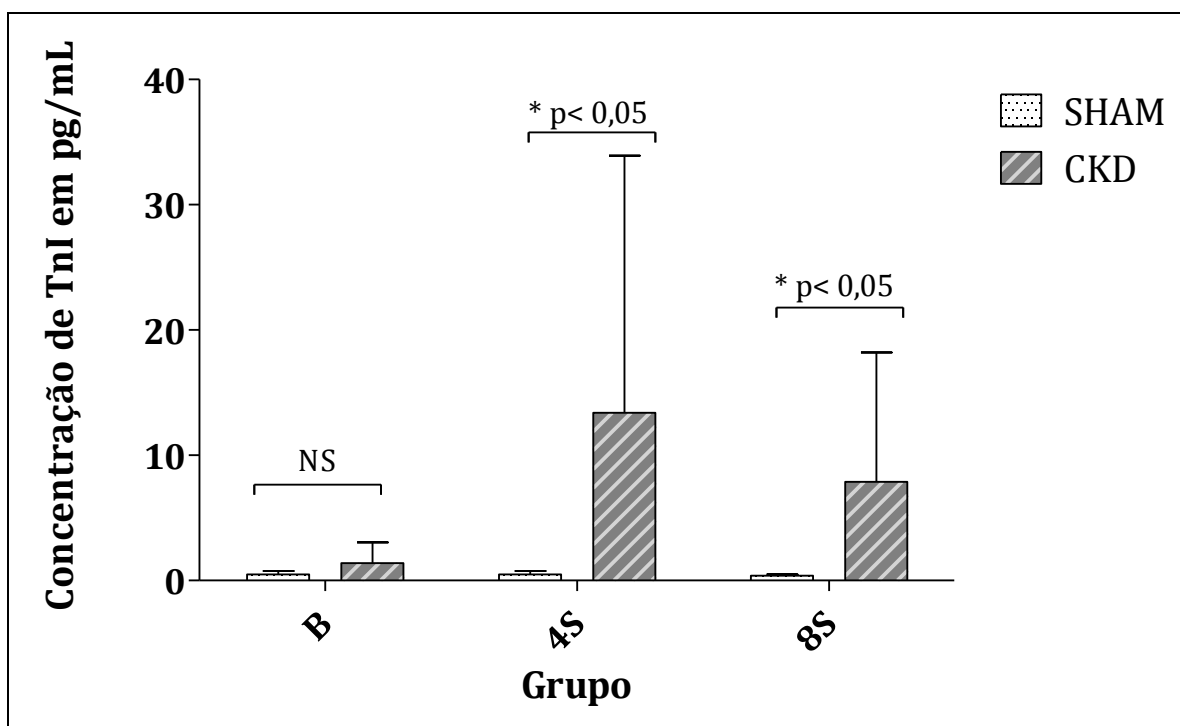


Figura 10 – Comparação das concentrações de troponina I (TnI) nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas, entre os grupos SHAM e CKD. SHAM B: n= 4; SHAM 4S: n= 4; SHAM 8S: n= 4; CKD B: n= 5; CKD 4S: n= 5; CKD 8S: n= 5.

De acordo com a análise estatística (Teste não paramétrico de Friedmann e Teste não paramétrico de Mann Whitney) a um nível de significância de 95% ( $\alpha=0,05$ ) não houve diferença significativa entre as dosagens de troponina I entre os grupos CKD e SHAM no tempo basal. Nos tempos de 4S e 8S houve aumento significativo nos níveis séricos de troponina I no CKD, em relação ao grupo SHAM.

Nas tabelas abaixo estão detalhados os valores de p para as comparações estabelecidas entre os grupos.

Tabela 5- Comparação entre níveis de TnI nos momentos B, 4S e 8S nos grupos SHAM e CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

<b>Grupo (TnI)</b>	<b>p-valor (B x 4S x 8S)</b>
<b>SHAM</b>	0,926
<b>CKD</b>	0,015

Tabela 6- Comparação entre níveis de TnI nos momentos B, 4S e 8S no grupo CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

<b>Momentos comparados (TnI)</b>	<b>p-valor</b>
<b>B x 4S</b>	<0,001
<b>B x 8S</b>	0,003
<b>4S x 8S</b>	0,067

Tabela 7- Comparação entre os níveis de TnI dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

<b>Momentos comparados (TnI)</b>	<b>p-valor (SHAM x CKD)</b>
<b>TnI B</b>	0,556
<b>TnI 4S</b>	0,016
<b>TnI 8S</b>	0,016

## 5.2.2 NT-proBNP

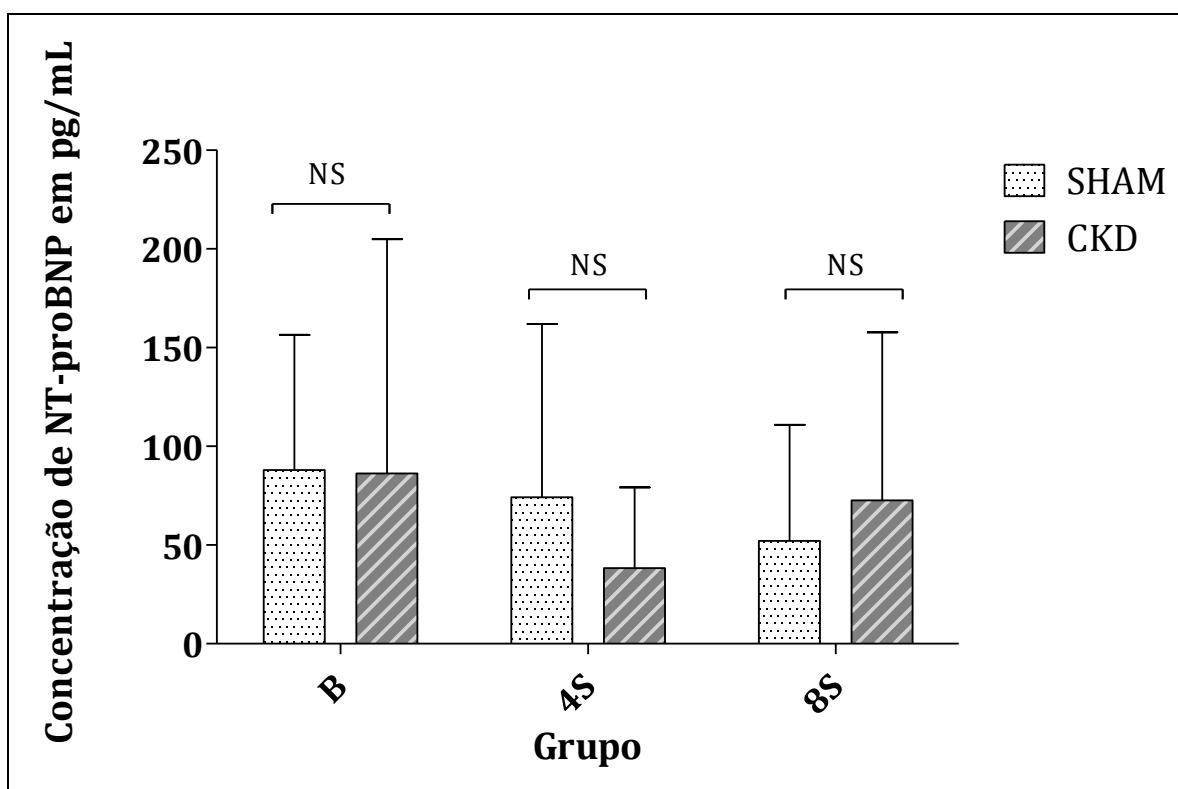


Figura 11– Comparação das concentrações de NT-proBNP nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas (8S), entre os grupos SHAM e CKD.

SHAM B: n= 7; SHAM 4S: n= 7; SHAM 8S: n= 7; CKD B: n= 5; CKD 4S: n= 5; CKD 8S: n= 5.

De acordo com a análise estatística (Teste não paramétrico de Friedmann e Teste não paramétrico de Mann Whitney) a um nível de significância de 95% ( $\alpha=0,05$ ) não houve diferença significativa entre as dosagens de NT-proBNP nos grupos SHAM e CKD em nenhum dos tempos analisados.

Nas tabelas abaixo estão detalhados os valores de p para as comparações estabelecidas entre os grupos.

Tabela 8- Comparação entre níveis de NT-proBNP nos momentos B, 4S e 8S nos grupos SHAM e CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

<b>Grupo (NT-proBNP)</b>	<b>p-valor (B x 4S x 8S)</b>
<b>SHAM</b>	0,102
<b>CKD</b>	0,819

Tabela 9- Comparação entre os níveis de NT-proBNP dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

<b>Momento comparado (NT-proBNP)</b>	<b>p-valor (SHAM x CKD)</b>
<b>NT-proBNP B</b>	0,639
<b>NT-proBNP 4S</b>	0,639
<b>NT-proBNP 8S</b>	0,755

## 5.2.3 IL-6

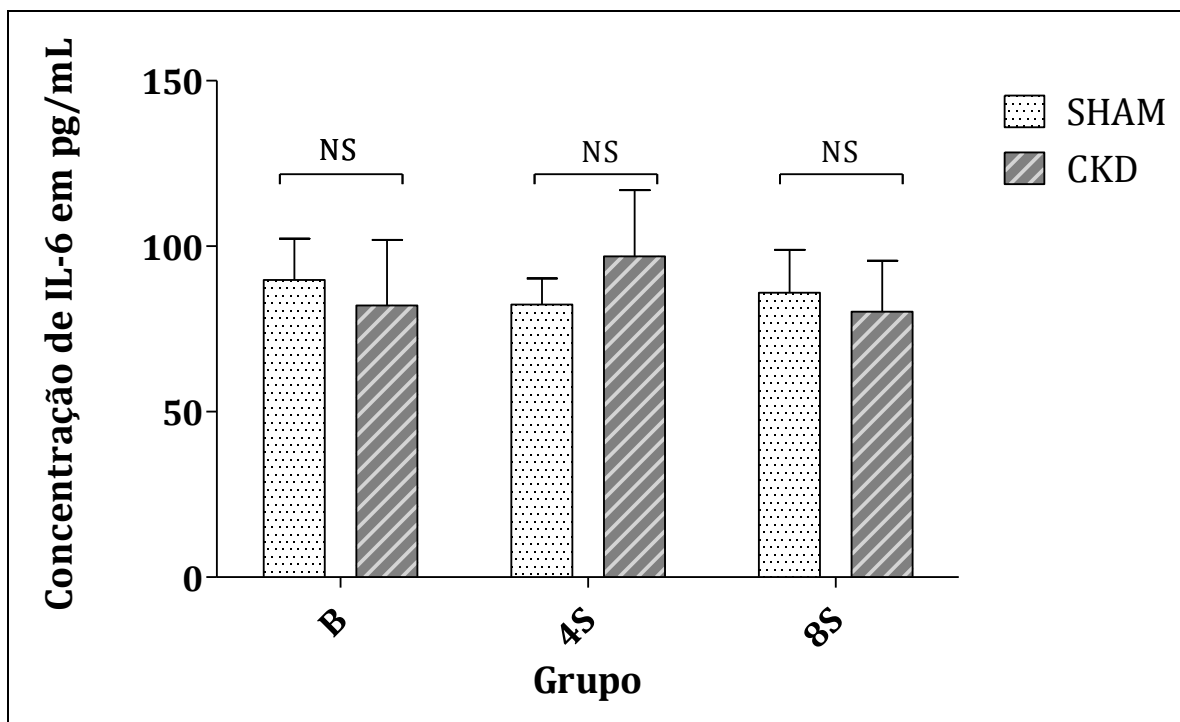


Figura 12– Comparação das concentrações de IL-6 nos tempos basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas, entre os grupos SHAM e CKD.

SHAM B: n= 7; SHAM 4S: n= 7; SHAM 8S: n= 7; CKD B: n= 8; CKD 4S: n= 8; CKD 8S: n= 8.

O grupo CKD apresentou níveis maiores de IL-6 em 4S ( $96,98 \pm 20,02$  pg/mL) os quais decaíram aos níveis basais (B=  $82,09 \pm 19,84$ ) em (8S) ( $80,18 \pm 15,42$ ), conforme mostrado na figura 13.



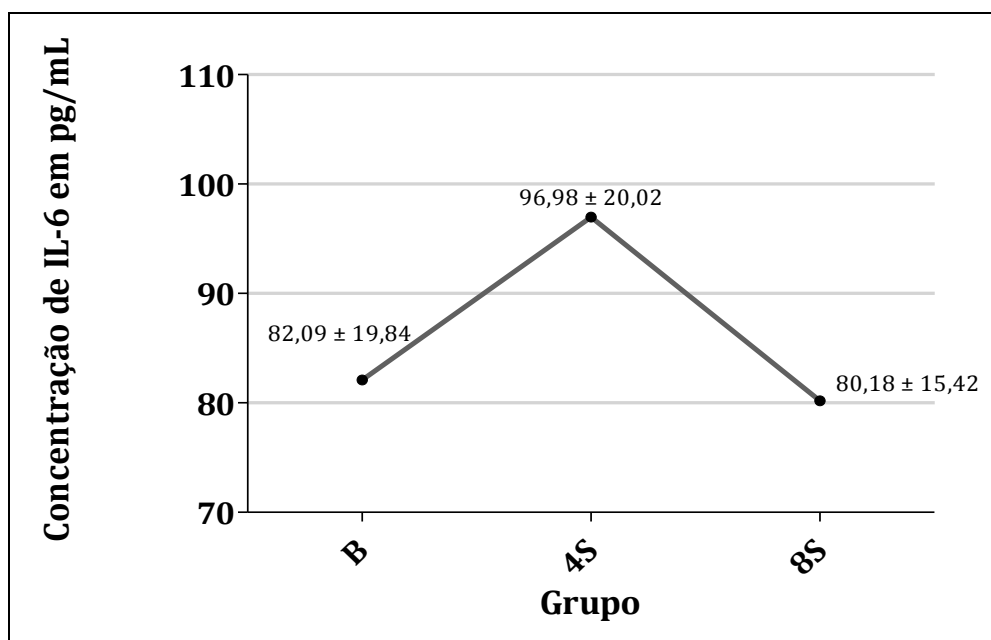


Figura 13- Níveis de IL-6 no grupo CKD ao longo do tempo de análise: Basal (B), 4 semanas (4S) e 8 semanas (8S).

Nas tabelas abaixo, também estão detalhados os valores de p para as comparações estabelecidas entre os grupos.

Tabela 10- Comparação entre níveis de IL-6 nos momentos B, 4S e 8S nos grupos SHAM e CKD, através do teste não paramétrico de Friedmann.

Grupo (IL-6)	p-valor (B x 4S x 8S)
SHAM	0,772
CKD	0,284

Tabela 11 - Comparação entre os níveis de IL-6 dos grupos SHAM e CKD nos momentos B, 4S e 8S pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

<b>Momento comparado (IL-6)</b>	<b>p-valor (SHAM x CKD)</b>
<b>NT-proBNP B</b>	0,121
<b>NT-proBNP 4S</b>	0,152
<b>NT-proBNP 8S</b>	0,232

## 6 DISCUSSÃO

As cirurgias de nefrectomia de 5/6 foram realizadas nos animais do grupo CKD visando o desenvolvimento de hipertrofia estrutural e funcional da porção remanescente dos néfrons, o que é previsto de acordo com o relatado por Hostetter *et al* (2001) e Hayslett (1979). Adaptações na microcirculação dos glomérulos remanescentes resultam em um considerável aumento na taxa de filtração glomerular (TFG) de cada néfron isoladamente, como tentativa de compensar a redução geral da TFG que ocorre na situação de redução de massa renal. Além disso, há indícios de que tal hiperfiltração é responsável pelas alterações morfológicas iniciais na porção remanescente dos rins de animais submetidos à redução de massa renal (HOSTETTER *et al*, 2001). Tal processo adaptativo, em que há sobrecarga de atividade da porção remanescente dos néfrons é condizente com o que ocorre durante a progressão da DRC, em que há redução progressiva da TFG à medida que a doença evolui, o que justifica a aplicação do modelo animal de nefrectomia de 5/6 para estudo da doença renal crônica (LEVEY & CORESH, 2012).

De acordo com os critérios estabelecidos por Chow *et al* (2003), para que um modelo animal experimental de uremia seja aceitável, este deve ser apropriado como um modelo de doença renal humana em amplo sentido, e tenha um grau de uremia padronizado. Além disso, tal modelo deve permitir fácil manipulação experimental, ser específico para DRC, sem outras patologias concomitantes, além de ter registros de referência excelentes sobre suas características biológicas normais, tais como dados de morfologia e laboratoriais. O modelo animal utilizado neste estudo corresponde a tais critérios, uma vez que se trata de animais dóceis e de fácil manipulação, ausentes de outras patologias, com vasta informação disponível acerca de suas características biológicas (KRINKE, 2000). No que se refere ao grau de uremia, foi observado que este se apresentou crescente ao longo do tempo analisado (basal, 4 e 8 semanas após as cirurgias), o que está de acordo com o que é previsto para ocorrer no contexto da implantação e progresso da DRC, já que a TFG tende a diminuir ao longo do tempo e à medida que a doença progride (KDIGO, 2012).

Em relação à execução das cirurgias, apesar da cirurgia de nefrectomia de 5/6 ser considerada simples, e poder ser realizada em uma única etapa, com o intuito de reduzir a mortalidade, trata-se de um procedimento minucioso, em que a taxa de mortalidade é considerável. No presente estudo, a taxa de mortalidade foi de aproximadamente 15% (?) (HOSTETTER *et al*, 2001).

No que se refere às dosagens de ureia, não houve diferença significativa entre os grupos CKD e SHAM no tempo basal. Nos tempos 4S e 8S houve aumento significativo e progressivo no grupo CKD quando comparados ao grupo SHAM. O mesmo modelo urêmico foi usado e caracterizado por Hauser (2009), quando foram realizadas dosagens de ureia e creatinina em ratos submetidos à cirurgia de nefrectomia de 5/6 e observou-se que tanto a ureia quanto a creatinina apresentaram-se crescentes no grupo CKD à medida que a doença progredia, apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo controle durante o período analisado. No presente estudo foram realizadas apenas dosagens de ureia, em virtude do reduzido volume de amostra disponível e da difícil aplicabilidade de técnicas de quantificação de creatinina para pequenos volumes de soro.

Valores de ureia relatados por autores que utilizaram animais submetidos à nefrectomia de 5/6 são variáveis, entretanto, assim como neste estudo, mantém-se a característica da uremia ser crescente ao longo do período analisado (BARAKE & GHOTNY, 2012; ZOU *et al*, 2014).

A ureia é um produto final do metabolismo do nitrogênio em mamíferos, sendo gerada principalmente no fígado e excretada pelos rins, a qual se apresenta altamente concentrada na urina, quando comparada aos níveis sanguíneos (ESTEVA-FONT *et al*, 2015). A concentração de ureia no plasma é determinada pelo equilíbrio entre sua produção e excreção pelos rins, sendo que esta é dependente da extensão de sua reabsorção (KIRTANE *et al*, 2005). Após as cirurgias, com a instalação progressiva da doença renal crônica no modelo animal, a excreção da ureia foi gradualmente reduzida, frente ao avanço da doença e prejuízo da capacidade dos rins em excretá-la, o que justifica a elevação nos níveis de ureia nos animais do grupo CKD.

A manutenção de níveis normais de potássio dentro de uma faixa fisiológica aceitável é essencial para o adequado funcionamento dos neurônios, cardiomiócitos e músculos esqueléticos, sendo que sua homeostase é consideravelmente dependente da função renal. Mais de 80% do potássio ingerido é excretado na urina. Embora este íon seja livremente filtrado através dos glomérulos, aproximadamente 90% deste é reabsorvido através do túbulo proximal e da alça de Henle (AYACH *et al*, 2015; WANG & GIEBISCH, 2009).

Tanto a DRC como a injúria renal aguda limitam a taxa de excreção do potássio, o que é consequência da redução do número de néfrons e de ductos coletores saudáveis (AYACH *et al*, 2015). Além de distúrbios na TFG e outras alterações renais, pacientes com DRC apresentam outros fatores e comorbidades que pioram a hipercalemia, tais como acidose metabólica, modificações na dieta, diabetes, doenças cardiovasculares e alguns medicamentos, como os inibidores do eixo renina angiotensina aldosterona, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores dos receptores de angiotensina (National Kidney Foundation, 2014; KOVESDY, 2014).

De acordo com a análise estatística realizada não houve diferença significativa nas dosagens de potássio entre os grupos CKD e SHAM em nenhum dos tempos analisados. Tal fato pode ser atribuído em parte à ausência de alguns fatores como a presença de comorbidades, ou o uso de medicamentos que viriam a interferir no metabolismo e excreção do potássio. Além disso, a capacidade do cólon em secretar potássio, à medida que a função renal declina tem uma importante contribuição na homeostase do potássio em pacientes com DRC (National Kidney Foundation, 2014), sendo que em condições basais, a excreção fecal de potássio apresenta-se aproximadamente três vezes maior em pacientes com insuficiência renal, quando comparados a pacientes com função renal normal (MATHIALAHAN *et al*, 2005).

Ainda, acredita-se que os rins apresentem uma capacidade de adaptação frente à redução do número de néfrons, aumentando a secreção de potássio pelos néfrons saudáveis, mantendo assim a normocalemia frente às condições de estado estacionário. Tal resposta adaptativa parece ser dependente do aumento da captação

de potássio pela membrana basolateral dos capilares peritubulares, o que é refletido por um aumento na atividade de Na-K-ATPase (KOVESDY, 2014; HAYSLETT & BINDER, 1982).

Em pacientes com DRC, elevados níveis de biomarcadores cardíacos são apontados como importantes preditores de mortalidade. Além disso, a mortalidade por causa cardiovascular aumenta à medida que a TFG declina (PARSA *et al*, 2012). Nestes pacientes, há uma maior prevalência de níveis persistentemente elevados de troponinas cardíacas, quando comparados a indivíduos que não tem DRC. Elevações nos níveis de troponina cardíaca estão associadas a um pior prognóstico para pacientes com DRC, com e sem suspeita de síndrome coronariana aguda (SCA) (MICHOS *et al*, 2014).

No que se refere à avaliação dos danos cardiovasculares no contexto da DRC em modelo animal poucos estudos foram publicados até o momento utilizando a troponina como marcador de injúria miocárdica (FREDERICKS *et al*, 2002). Ao utilizar um modelo animal de DRC para avaliação das consequências da SCR nesta pesquisa, pode-se usufruir de algumas vantagens em relação ao estudo em humanos com DRC, tais como a ausência de comorbidades e do uso de medicamentos, bem como variações interindividuais que poderiam influenciar no desenvolvimento da patologia. Avaliando-se primeiramente a história natural da SCR, a qual não se apresenta completamente compreendida (MAHAPATRA *et al*, 2009), pretende-se elucidar aspectos base de sua fisiopatologia, possibilitando a identificação de pontos-chave neste processo, para que futuramente sejam propostas alternativas de diagnóstico, monitoramento e intervenção de suas consequências.

Em relação a estudos de troponina em modelos animais, sabe-se que o gene da troponina cardíaca apresenta certa variabilidade entre espécies, e alguns cuidados devem ser adotados ao utilizar ensaios comercialmente disponíveis neste tipo de pesquisa (CHRISTENSON & CHRISTENSON, 2013). Entretanto, alguns ensaios para cTnI disponíveis comercialmente são efetivos em animais, e além disso, alguns ensaios destinados à animais também funcionam em humanos (O'BRIEN *et al*, 2006).

O ensaio *STAT Troponin I (Abbott Diagnostics)*, utilizado neste estudo, foi efetivo na detecção dos níveis séricos de troponina ao longo do tempo analisado. Em estudo realizado por Apple *et al* (2008), em que foi avaliada a performance de diversos ensaios para TnI destinados a amostras de soro humano, o ensaio da *Abbott Diagnostics*, para o equipamento *Architect* apresentou um bom perfil de reatividade para TnI, bem como um bom perfil de precisão, tanto para amostras provenientes de ratos Wistar como Sprague-Dawley.

No presente estudo, foi observado um aumento significativo nos níveis de troponina (TnI) após 4 e 8 semanas da cirurgia de indução da doença renal, no grupo CKD, quando comparado ao grupo controle (SHAM), momento este que coincide com o declínio da função renal, caracterizado pela uremia significante. De forma semelhante, estudo realizado por Fredericks *et al* (2002), que avaliou os níveis séricos de troponina cardíaca em ratos submetidos à nefrectomia de 5/6, relata níveis séricos significativamente aumentados de TnT nos animais do grupo urêmico, 8 semanas após a cirurgia, quando comparados ao grupo controle.

Embora existam algumas controvérsias, acredita-se que a elevação da troponina em pacientes com DRC não está associada com a reduzida depuração renal, a qual é a característica desta situação patológica, mas representando preferencialmente um marcador de injúria miocárdica. Além disso, a molécula de troponina é relativamente grande, o que indica que os rins não sejam os principais responsáveis por sua depuração sanguínea (MICHOS *et al*, 2014).

Outro fato que justifica que a elevação da troponina em tal condição está relacionada às causas cardiovasculares e não à redução de sua depuração pois a melhora na função renal após o transplante não altera a ocorrência de elevados níveis de troponinas cardíacas em pacientes em DRC (FREDERICKS *et al*, 2001). Em um estudo retrospectivo, avaliando os níveis de troponina I após situação de necrose miocárdica, a meia vida de eliminação e a meia vida aparente da troponina I cardíaca não se apresentam diferentes entre pacientes com função renal normal e em estágio final da DRC (ELLIS *et al*, 2001).

No contexto da síndrome cardiorrenal, acredita-se que os níveis aumentados de troponina no grupo CKD, nos tempos de 4S e 8S sejam atribuídos à injúria

miocárdica gerada em consequência da progressão da DRC. Tal achado corrobora com o encontrado em pacientes em estágio avançado da DRC, em diálise, em que há uma alta prevalência de níveis elevados de troponinas, na ausência de sintomas cardiovasculares (KALAJI & ALBITAR, 2012).

Até o momento não foi estabelecida uma etiologia definitiva para tal aumento, entretanto este pode ser resultado de necrose miocárdica silenciosa, hipertrofia ventricular esquerda, disfunção endotelial secundária ao estresse oxidativo e à inflamação, disfunção sistólica ventricular esquerda, aumento da sobrecarga cardíaca com distensão miocárdica, além de injúria miocárdica secundária à deposição de cálcio e oxalato (BABUIN & JAFFE, 2005).

O pico de elevação de TnI na quarta semana pode ser atribuído à liberação do *pool* citosólico de troponina dos cardiomiócitos, responsável pela detecção recente de troponina cardíaca após a injúria em consequência do avanço da DRC, já a persistência dos níveis significantemente elevados na oitava semana pode estar associada com a liberação de troponina cardíaca proveniente do *pool* estrutural dos cardiomiócitos, o que em parte justifica a prolongada permanência deste marcador na circulação (JAFFE & WU, 2012).

Não foi encontrada diferença significativa nas dosagens de NT-proBNP entre os grupos CKD e SHAM nos tempos analisados. Sendo o NT-proBNP um marcador de distensão e insuficiência cardíaca, provocadas por uma sobrecarga de volume, presente em pacientes com DRC (DZIEDZIC *et al*, 2013), acredita-se que tais alterações cardíacas não tenham sido desenvolvidas ou detectadas pela técnica de análise adotada no modelo animal utilizado neste estudo.

Foram relatados elevados níveis de NT-proBNP associados com o alto grau de ativação do eixo renina-angiotensina aldosterona, provocando vasodilatação sistêmica e hipoperfusão renal (LIU *et al*, 2015), porém em modelos animais de DRC tal associação não foi avaliada.

Elevações nos níveis de NT-proBNP têm sido evidenciadas em pacientes com DRC em diversos estágios da doença, sintomáticos e assintomáticos para DCV (HORII *et al*, 2013; DZIEDZIC *et al*, 2013; DAVID *et al*, 2008; KHAN *et al*, 2006), sendo que seus níveis aumentam à medida que a TFG decai, e estes são ainda mais



altos na presença da insuficiência cardíaca (JAFRI *et al*, 2013). Entretanto, em modelos animais de nefrectomia de 5/6 para estudo da DRC tal achado não foi relatado até o presente momento. A medida dos níveis séricos de NT-proBNP em ratos e outros modelos animais já foi determinada através de imunoensaios em um reduzido número de estudos, abordando outras situações que não a DRC (HEMALATHA *et al*, 2006; MUNCH *et al*, 2014).

O fato do TnI ter se apresentado elevado após 8 semanas no grupo CKD enquanto o marcador NT-proBNP não, pode ser atribuído à alguns fatores, como o fato da elevação da TnI caracterizar injúria miocárdica, enquanto o NT-proBNP caracteriza distensão dos cardiomiócitos, ou seja, tais alterações possuem mecanismos e prováveis agentes causadores distintos (BIMA *et al*, 2012; HALL, 2004).

Outro fator que pode exercer influência nos níveis do marcador NT-proBNP é que no modelo animal utilizado ocorrem alterações adaptativas nos néfrons remanescentes, havendo hiperfiltração. As alterações hemodinâmicas que ocorrem após a cirurgia de nefrectomia 5/6 estão associadas às lesões estruturais nos glomérulos remanescentes, podendo haver destruição esclerótica destes, a qual pode ser acompanhada de progressiva proteinúria e uremia (HOSTETTER *et al*, 2001).

Foi realizada a análise histopatológica do miocárdio dos mesmos animais dos quais foram coletadas as amostras de soro para a realização deste estudo (Hauser *et al*, 2012). Foram observados fibrose e hipertrofia miocárdica significativas na 8ª semana no grupo CKD indicando um remodelamento miocárdico induzido pela uremia. Entretanto, conforme relatado anteriormente, apesar das evidências de hipertrofia ventricular esquerda nestes animais, a qual já foi evidenciada em pacientes com DRC e que está associada com níveis séricos elevados de NT-proBNP (JAFRI *et al*, 2013), tal aumento não foi encontrado na análise de biomarcadores no presente estudo.

A inflamação é apontada como um dos conectores cardiorrenais para o desenvolvimento da síndrome cardiorrenal, apesar de pouco compreendida (MAHAPATRA *et al*, 2009). No presente estudo, os níveis séricos de IL-6 não se apresentaram significativamente elevados em nenhum dos tempos de análise. Em

estudo realizado por Hauser *et al* (2012) na análise histopatológica destes animais, observada a expressão do biomarcador TNF- $\alpha$  no miocárdio significativamente aumentada na 4ª semana. Tais resultados indicam que a uremia presente nestes animais, como característica da DRC é capaz de promover um estado inflamatório crônico em que há o envolvimento de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , o qual faz parte de um processo denominado disfunção imune relacionada à uremia, caracterizado por desordens no sistema imune inato e adaptativo, ainda que os níveis de IL-6 não tenham se apresentado significantes (HAUSER *et al*, 2008).

Acredita-se que o prejuízo da função renal por si e como consequência da toxicidade urêmica possa ser responsável pelos níveis elevados de biomarcadores inflamatórios. O perfil de expressão do TNF-  $\alpha$  na imunohistoquímica (HAUSER *et al*, 2012) na quarta semana e da TnI com pico na quarta semana e permanecendo elevada na oitava semana caracteriza um dos processos de conexão entre coração e rins presentes na síndrome cardiorrenal. O desenvolvimento de um processo inflamatório crônico é um dos pontos-chave de conexão entre esses dois órgãos, em que o dano em um órgão é capaz de induzir progressivo declínio da função do outro, sendo que o desequilíbrio entre óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, o desenvolvimento de processo inflamatório, e a atividade aumentada do eixo renina-angiotensina são apontados como causas da síndrome cardiorrenal (MAHAPATRA *et al*, 2009).

Conclui-se que há evidências do desenvolvimento da síndrome cardiorrenal nos animais do grupo CKD avaliados neste estudo. A síndrome cardiorrenal desenvolvida é do tipo IV, em que a instalação de uma CKD contribui para o declínio da função cardíaca, caracterizado aqui pelo aumento nos níveis de TnI na oitava semana (RONCO *et al*, 2008).

Assim, é possível afirmar que a TnI como a IL-6 poderiam ser aplicados como bons biomarcadores para a avaliação dos danos cardiovasculares em consequência do avanço da síndrome cardiorrenal, uma vez que doenças cardiovasculares são apontadas como a causa de morte de pelo menos metade dos indivíduos acometidos pela insuficiência renal (LEKAWANVIJIT & KRUM, 2014).

Entretanto, no âmbito da DRC, o uso de biomarcadores ainda corresponde a um desafio nas áreas clínica e de pesquisa (SHLIPACK & DAY, 2013). Portanto, estudos que avaliem a efetividade e a aplicabilidade de tais biomarcadores na prática clínica para o manejo de pacientes com DRC ainda são necessários.

## 7 CONCLUSÕES

As cirurgias de nefrectomia de 5/6 foram capazes de induzir o desenvolvimento do modelo DRC, caracterizado pela uremia crescente.

Os níveis séricos de TnI apresentaram-se significativamente elevados no grupo CKD na quarta e na oitava semana, caracterizando a presença de injúria miocárdica.

Os níveis séricos de NT-proBNP não se apresentaram elevados em nenhum dos grupos nos tempos avaliados, indicando que não foi evidenciado dano cardíaco em resposta à sobrecarga de volume e estiramento dos cardiomiócitos no modelo animal estudado.

Os níveis séricos de IL-6 não se apresentaram significativamente aumentados na quarta semana, entretanto, o perfil de elevação da expressão do TNF alfa na quarta semana e o retorno aos níveis basais na oitava semana no grupo CKD indicam a p

resença de um processo inflamatório que precede a injúria miocárdica. O desenvolvimento de processo inflamatório que antecede a injúria miocárdica caracteriza um dos conectores cardiorrenais presentes na síndrome cardiorrenal, indicando o desenvolvimento desta no grupo CKD estudado.

O biomarcador TnI apresenta potencial promissor para sua aplicabilidade no monitoramento das consequências cardiovasculares da DRC, porém estudos adicionais quanto ao seu uso clínico ainda são necessários.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA DUARTE, J.B.; AGUILAR-NASCIMENTO, J.E.; NASCIMENTO M. Bacterial translocation in experimental uremia. **Urol Res.**, v. 32, p.266–270, 2004 .

APPLE, F. S.; MURAKAMI, M. M.; LER, R.; WALKER, D.; YORK, M. Analytical Characteristics of Commercial Cardiac Troponin I and T Immunoassays in Serum from Rats, Dogs, and Monkeys with Induced Acute Myocardial Injury. **Clinical Chemistry**, v. 54 (12), p. 1982–1989, 2008.

AYACH, T.; NAPPO, R. W.; PAUGH-MILLER, J. L.; ROSS, E. A. Postoperative hyperkalemia. **European Journal of Internal Medicine**, 06 p., 2015.

BABUIN, L.; JAFFE, A .F. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. **CMAJ**, v. 173(10), p.191-202, 2005.

BAGGISH, A. L.; VAN KIMMENADE, R. R. J.; JANUZZI, J.L. The Differential Diagnosis of an Elevated Amino-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Level. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, p.43-48, 2008.

BARAKA, A.; EL GHOTNY, V. Cardioprotective Effect of Renalase in 5/6 Nephrectomized Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v.17(4), p. 412-416, 2012.

BIAN, X.H.; ZHOU, G.Y.; WANG, L.N.; MA, J.F.; FAN, Q.L.; LIU, N.; BAI, Y.; GUO, W.; WANG, Y.Q.; SUN, G.P.; HE, P.; YANG, X.; SU, X.S.; DU, F.; ZHAO, G.F.; MIAO, J.N.; MA, L.; ZHENG, L.Q.; LI, D.T.; FENG, J.M. The role of CD44-hyaluronic acid interaction in exogenous mesenchymal stem cells homing to rat remnant kidney. **Kidney Blood Press Res**, v.38(1), p.11-20, 2013.

BIMA, A; SIKARIS. K. Towards appreciating appropriate clinical responses to highly sensitive cardiac troponin assays **Intern. Med. J.**, v. 42 (5), p.16-22, 2012.

CHAE, H.W.; SHIN J.I.; KWON, A.R.; KIM, H.S.; KIM, D.H. Spot urine albumin to creatinine ratio and serum cystatin C are effective for detection of diabetic

nephropathy in childhood diabetic patients. **J Korean Med Sci**, v.27, p. 784-787, 2012.

CHAWLA, L.S.; KIMMEL, P.L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: An integrated clinical syndrome. **Kidney Int**, v. 82(5), p. 516, 2012.

CHEN, S.; HUANG, C.; WU, B.; LIAN, X.; MEI, X.; WAN, J. Cardiac Troponin I in Non- Acute Coronary Syndrome Patients with Chronic Kidney Disease. **PLoS ONE**, v. 8(12), p. 1-7, 2013.

CHOW, K.; LIU, Z.; CHANG, T. M. Animal Remnant Kidney Model of Chronic Renal Failure Revisited. **Hong Kong J Nephrol**, v.5(2), p. 57-64, 2003.

CHRISTENSON, E.; CHRISTENSON, R. H. Characteristics of cardiac troponin measurements. **Coronary Artery Disease** v. 24 (8), p. 698-704, 2013.

CORDWELL, S.J.; EDWARDS, A.V.; LIDDY, K.A.; MOSHKANBARYANS, L.; SOLIS, N.; PARKER, B.L.; YONG, A.S.; WONG, C.; KRITHARIDES, L.; HAMBLY, B.D.; WHITE, M.Y. Release of tissue-specific proteins into coronary perfusate as a model for biomarker discovery in myocardial ischemia/reperfusion injury. **J Proteome Res.** v. 11(4), p.2114-2126, 2012.

DAVID, S.; KUMPERS, P.; SEIDLER, V.; BIERTZ, F.; HALLER, H.; FLISER, D.; Diagnostic value of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) for left ventricular dysfunction in patients with chronic kidney disease stage 5 on haemodialysis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, p.1370–1377, 2008.

DELANAYE, P.; MARIAT, C. The applicability of eGFR equations to different populations . **Nat Rev Nephrol**, v.9(9), p. 513-522, 2013.

DONNINO, M. W.; KARRIEM-NORWOOD, V.; RIVERS, E. P.; GUPTA, A.; NGUYEN, H. B.; JACOBSEN G.; MCCORD, J.; TOMLANOVICH, M. C. Prevalence of Elevated Troponin I in End-stage Renal Disease Patients Receiving Hemodialysis. **Academic Emergency Medicine**, v. 11(9), p. 979-981, 2008.

DREES, J. C.; WU, A. H. B. Analytical Techniques. In: BISHOP, M. L.; FODY, E. P.; SCHOEFF, L. E. **Clinical Chemistry: techniques, principles, correlations**. 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2010. p. 130-165.

DZIEDZIC, M.; PETKOWICZ, B.; BEDNAREK-SKUBLEWSKA, A.; SOLSKI, J.; BUCZAJ, A.; CHOINA, P. Relationship between renalase and N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide (NT pro-BNP) in haemodialysis patients. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 21(1), p.132–135, 2014.

ELLIOTT, P.; ANDERSSON, B.; ARBUSTINI, E.; BILINSKA, Z.; CECCHI, F.; CHARRON, P.; DUBOURG, O.; KUHLE, U.; MAISCH, B.; MCKENNA, W. J.; MONSERRAT, L.; PANKUWEIT, S.; RAPEZZI, C.; SEFEROVIC, P.; TAVAZZI, L.; KEREN, A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. **European Heart Journal**, v.29, p. 270–276, 2008.

ELLIOTT, R. W. Demographics of the older adult and chronic kidney disease: a literature review. **Nephrol Nurs J.**, v.39 (6), p. 491-496, 2012.

ELLIS, K.; DREISBACH, A.W.; LERTORA, J.L. Plasma elimination of cardiac troponin I in end-stage renal disease. **Southern Medical Journal**, v. 94(10), p. 993-996, 2001.

ESTEVA-FONT, C.; ANDERSON, M. O.; VERKMAN, A. S. Urea transporter proteins as targets for small-molecule diuretics. **Rev. Nephrol.** **11**, p.113–123, 2015.

FELKER, G.M.; PETERSEN, J.W.; MARK, D.B. Natriuretic peptides in the diagnosis and management of heart failure. **CMAJ**, v.175, p. 611–617, 2006.

FLORES-SOLÍS, L.M.; HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, J.L. Cardiac troponin I in patients with chronic kidney disease stage 3 to 5 in conditions other than acute coronary syndrome. **Clin Lab**, v. 60(2), p.281-290, 2014.

FLYNN, T.G.; DE BOLD, M.L.; DE BOLD, A.J. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. **Biochem Biophys Res Commun**, v.117, p.859 –865, 1983.

FREDERICKS, S.; CHANG, R.; GREGSON, H.; BEWICK, M.; COLLINSON, P. O.; GAZE, D. ; CARTER , N. D.; HOLT, D. W. Circulating cardiac troponin-T in patients before and after renal transplantation. **Clinica Chimica Acta**, v. 310, p 199–203, 2001.

FREDERICKS, S.; MURRAY, J. F.; CARTER, N. D.; CHESSER, A. M. S.; PAPACHRISTOU,S.; YAQOOB, M.; COLLINSON, P. O.; GAZE, D.; HOLT, D.W. Cardiac Troponin T and Creatine Kinase MB Content in Skeletal Muscle of the Uremic Rat. **Clinical Chemistry**, v. 48(6), p. 859–868, 2002.

GLUBA-BRZÓZKA, A.; MICHALSKA-KASICZAK, M.; FRANCZYK-SKÓRA, B.; NOCUN, M.; BANACH, M.; RYSZ, J. Markers of increased cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. **Lipids in Health and Disease**, v.13:135, 2014.

GOROSTIDI, M.; SANTAMARÍA, R. , ALCÁZAR, R.; FERNÁNDEZ-FRESNEDO, G.; GALCERÁN, J. M.; GOICOECHEA, M.; OLIVERAS, A.; PORTOLÉS, J.; RUBIO, E.; SEGURA, J.; ARANDA, P.; FRANCISCO, A. L. M.; PINO, M. D.; FERNÁNDEZ-VEJA, F.; GÓRRIZ, J. L.; LUÑO, J.; MARÍN, R.; MARTÍNEZ, I.;MARTÍNEZ-CASTELA, A.; ORTE, L. M.; QUEREDA, C.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. C.; RODRÍGUEZ, M.; RUILOPE, R. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. **Nefrologia**, v.34(3), p.302-316, 2014.

HALL, C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. **The European Journal of Heart Failure**, v.6, p.257–260, 2004.

HALLGRÍMSSON, B.; BENEDIKTSSON, H.; VIZE, P. Anatomy and Histology of the Human Urinary System. In: VIZE, P. D.; WOOLF, A. S.; BARD, J. B. L. **The Kidney: From Normal Development to Congenital Disease**. London: Academic Press, 2003. p. 149-164.

HARTMAN, J.; FRISHMAN, W. J. Inflammation and Atherosclerosis: A Review of the Role of Interleukin-6 in the Development of Atherosclerosis and the Potential for Targeted Drug Therapy. **Cardiology in Review**, v. 22 (3), p. 147-151, 2014.

HAUSER, A. B.; STINGHEN, A. E. M.; KATO, S.; BUCHARLES, S.; AITA, C.; YUZAWA, Y.; PECOITS-FILHO, R. Characteristics and causes of immune



dysfunction related to uremia and dialysis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 20 (3), p. S1-S5, 2008.

HAUSER, A. B. **Avaliação do impacto do carbonato de sevelamer nos níveis circulantes de endotoxinas e do fator de necrose tumoral alfa em um modelo experimental de insuficiência renal**. 90f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2009.

HAUSER, A. B.; STINGHEN, A. E. M.; GONÇALVES, S.; BUCHARLES, S.; PECOITS-FILHO, R. A Gut Feeling on Endotoxemia: Causes and Consequences in Chronic Kidney Disease. **Nephron Clin Pract**, v.118, p. 165–172, 2011.

HAUSER, A. B.; CARVALHO, V.; GRIBNER, C.; LUVIZOTTO, M. J.; CARNEIRO, D.; CUSTODIO, M.; NORONHA, L.; PECOITS-FILHO, R. Uremia-induced inflammation preceeds myocardiac fibrosis in an animal model of uremia. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, p. 1004, 2012.

HAUSER, A. B. ; DIONÍSIO, L. M.; ROBES, F.; GRIBNER, C.; CARVALHO, V.; CARNEIRO, D.; LUVIZOTTO, M.; NORONHA, L.; PECOITS-FILHO, R. Análise da hipertrofia cardíaca, fibrose miocárdica e inflamação para a avaliação de um modelo de miocardiopatia urêmica experimental. **J Bras Nefrol**, v. 36(3 Supl. 1), p. 73, 2014.

HAYSLETT, J. P. Functional adaptation to reduction in renal mass. **Physiol Rev**, v. 59(1), p.137-64, 1979.

HAYSLETT, J. P.; H. J. BINDER. Mechanism of potassium adaptation. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 243 (2), p. 103-112, 1982.

HEMALATHA, T; VAIJAYANTHI MALA, V.; MANOHAR, B.; NAYEEM, M.; SUBRAMANIAM, S.; PUVANAKRISHNAN, R. Studies on biochemical markers in cryoinfarction in rats. **Cryo Letters**, v.27, p. 311-318, 2006.

HERGET-ROSENTHAL, S.; BÖKENKAMP, A.; HOFMANN, W. How to estimate GFR-serum creatinine, serum cystatin C or equations?. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 153–161, 2007.

HICKMAN, P.E.; POTTER, J.M.; ARONEY, C.; KOERBIN, G.; SOUTHCOTT, E.; WU, A.H. *et al.* Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. **Clin Chim Acta**, v.411, p. 318–23, 2010.

HIRAMOTO, J. S.; KATZ, R.; PERALTA, C. A.; IX, J. H.; FRIED, L.; CUSHMAN, M.; SISCOVICK, D.; PALMAS, W.; SARNAK, M.; SHLIPAK, M. G. Inflammation and Coagulation Markers and Kidney Function Decline: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Am J Kidney Dis.**, v. 60(2), p.225-232, 2012.

HORII, M.; MATSUMOTO, T.; UEMURA, S.; SUGAWARA, Y.; TAKITSUME, TOMOYA UEDA, A.; NAKAGAWA, H.; NISHIDA, T.; SOEDA, T.; OKAYAMA, S.; SOMEKAWA, S.; ISHIGAMI, K.; TAKEDA, Y.; KAWATA, H.; KAWAKAMI, R.; SAITO, Y. Prognostic value of B-type natriuretic peptide and its amino-terminal proBNP fragment for cardiovascular events with stratification by renal function. **Journal of Cardiology**, v. 61, p. 410–416, 2013.

HOSTETTER, T.H.; OLSON, J.L.; RENNKE, H.G.; VENKATACHALAM, M.A. BRENNER BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **J Am Soc Nephrol**, v.12:, p.1315–1325, 2001.

HOUSMAN, A.E.; SHROPSHIRE, A. **Incidence and prevalence.** United States Renal Data System. 2010 Annual Data Report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States, vol 2, Atlas of ESRD. 2010. E book. Disponível em <[http://www.usrds.org/2010/pdf/v2\\_02.pdf](http://www.usrds.org/2010/pdf/v2_02.pdf)>. Acesso em 10/07/2014.

JAFFE, A. S.; WU, A. H. B. Troponin Release—Reversible or Irreversible Injury? Should We Care? **Clinical Chemistry**, v. 58, p.148–150, 2012.

JAFRI, L.; KASHIF, W.; TAI, J.; SIDDIQUI, I.; AZAM, I.; SHAHZAD, H. ; GHANI, F. B-type natriuretic peptide versus amino terminal pro-B type natriuretic peptide: selecting the optimal heart failure marker in patients with impaired kidney function. **BMC Nephrology**, v. 14, p.117, 2013.

JHA, V.; GARCIA-GARCIA, G.; ISEKI, K.; LI, Z.; NAICKER, S.; PLATTNER, S.; SARAN, R.; WANG, A.; YANG, C. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **Lancet**, v. 382(9888), p. 260-272, 2013.

JONG, P.E.; CURHAN, G.C. Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: public health perspectives. **J Am Soc Nephrol**, v.17, p. 2120–2126, 2006.

KALAJI, F. R.; ALBITAR, S. Predictive Value of Cardiac Troponin T and I in Hemodialysis Patients. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 23(5), p.939-945, 2012.

KATRUKHA, I. A. Human Cardiac Troponin Complex. Structure and Functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, No. 13, p. 1447-1465, 2013.

KDIGO. KDIGO (Kidney Disease Improving global Outcomes) 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Official Journal of the International Society of Nephrology**, v. 3 (1), 2013. Disponível em: [http://www.kdigo.org/clinical\\_practice\\_guidelines/pdf/CKD/KDIGO\\_2012\\_CKD\\_GL.pdf](http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf)

KHAN, I. A.; FINK, J.; NASS, C.; CHEN, H.; CHRISTENSON, R.; DEFILIPPI, C. R. N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide and B-Type Natriuretic Peptide for Identifying Coronary Artery Disease and Left Ventricular Hypertrophy in Ambulatory Chronic Kidney Disease Patients. **Am J Cardiol**, v.97, p.1530 –1534, 2006.

KIM, H.J.; VAZIRI, N.D. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol**.v. 298, p. 662–671, 2010.

KIRTANE, A.J.; LEDER, D.M.; WAIKAR, S.S.; CHERTOW, G.M.; RAY, K.K.; PINTO, D.S. ;KARMPALLOTIS, D.; BURGER, A.J.;MURPHY, S.A.; CANNON, C.P.; BRAUNWALD, E.; GIBSON, C.M. Serum blood urea nitrogen as an independent marker of subsequent mortality among patients with acute coronary syndromes and normal to mildly reduced glomerular filtration rates. **J Am Coll Cardiol**. v. 45(11), p.1781-1786, 2005.

KOVESDY, C. P. Management of hyperkalaemia in chronic kidney disease.

**Nature Reviews Nephrology**, v. 10, p. 653–662, 2014.

KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000.

KUSTER, N.; MORÉNA, M.; BARGNOUX, A.; LERAY, H.; CHENINE, L.; DUPUY, A.; CANAUD, B.; CRISTOL, J. Biomarqueurs du syndrome cardiorénal. **Ann Biol Clin**, v.71 (4), p. 409-418, 2013.

LAMBERS-HEERSPINK, H.J.; GANSEVOORT, R.T.; BRENNER, B.M.; COOPER, M.E.; PARVING, H.H.; SHAHINFAR, S.; DE ZEEUW, D. Comparison of Different Measures of Urinary Protein Excretion for Prediction of Renal Events. **J Am Soc Nephrol**, v. 21(8), p. 1355- 1360, 2010.

LAW, B. **Immunoassay: A Practical Guide**. London: Taylor & Francis, 2005.

LEKAWANVIJIT, S., KOMPA, A. R., WANG, B. H., DARREN, J. K., KRUM, H. Cardiorenal Syndrome : The Emerging Role of Protein-Bound Uremic Toxins. **Circ Res.**, v.111, p. 1470-1483, 2012.

LEKAWANVIJIT, S.; KRUM, H. Cardiorenal Syndrome: Acute Kidney Injury Secondary to Cardiovascular Disease and Role of Protein-Bound Uremic Toxins. **J Physiol**. v.592, p. 3969-3983, 2014.

LEVEY, A. S.; CORESH, J. Chronic kidney disease. **Lancet**, v. 379, p. 165–180, 2012.

LEWANDROWSKI, K.; CHEN, A.; JANUZZI, J. Cardiac Markers for Myocardial Infarction :A Brief Review. **Am J Clin Pathol**, v. 118(1), p. S93-S99, 2002.

LIU, Y.; LIU, Y.; ZHOU, Y.; YU, D.; HE, P.; XIE, N.; LI, H.; GUO, W.; CHEN, J.; TAN, N. Association of N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide With Contrast-Induced Nephropathy and Long-Term Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease and Relative Preserved Left Ventricular Function. **Medicine**, v. 94 (13), p.1-9, 2015.

MAGACHO. E. J. C.; PEREIRA, A .C.; MANSUR, H. N.; BASTOS, M. G. Nomograma para a Estimação da Taxa de Filtração Glomerular baseado na Fórmula CKD-EPI. **J Bras Nefrol**, v. 34(3), p.313-315, 2012.

MAGHAMIOUR, N.; SAFAIE, N. High Creatine Kinase (CK)-MB and Lactate Dehydrogenase in the Absence of Myocardial Injury or Infarction: A Case Report . **J Cardiovasc Thorac Res**, v. 6(1), p. 69-70, 2014.

MAHADAVAN, G.; NGUYEN, T. H.; HOROWITZ, J. D. Brain natriuretic peptide: a biomarker for all cardiac disease? **Curr Opin Cardiol**, v. 29, p. 160–166, 2014.

MAHAPATRA, H. S.; LALMALSAWMA, R.; SINGH, N. P.; KUMAR, M.; TIWARI S. C. Cardiorenal Syndrome. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 3 (2 ), p. 61 -70, 2009.

MATHIALAHAN, T.; MACLENNAN, K. A.; SANDLE, L. N.; VERBEKE, C.; SANDLE, G. I. Enhanced large intestinal potassium permeability in end-stage renal disease. **Journal of Pathology**. v. 206, p. 46–51, 2005.

MICHOS ED, BERGER Z, YEH HC, SUAREZ-CUERVO C, WILSON LM, STACY S, BASS EB. Cardiac Troponins Used as Diagnostic and Prognostic Tests in Patients With Kidney Disease. **Comparative Effectiveness Review**, v. 135, 2014. Disponível em: <[www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm](http://www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm)>

MÜNCH, F.; PURBOJO, A.; KELLERMANN, S.; JANSSEN, C.; CESNJEVAR, R.A.; RÜFFER, A. Improved contractility with tepid modified full blood cardioplegia compared with cold crystalloid cardioplegia in a piglet model. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, p. 1–8, 2014.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **Clinical Update on hyperkalemia: A Chronic Risk for CKD Patients and a Potential Barrier to Recommended CKD Treatment**, 2014. Disponível em: [https://www.kidney.org/sites/default/files/02-10-6785\\_HBE\\_Hyperkalemia\\_Bulletin.pdf](https://www.kidney.org/sites/default/files/02-10-6785_HBE_Hyperkalemia_Bulletin.pdf)

NIBALI, L.; FEDELE, N.; D’AIUTO, F.; DONOS, N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. **Oral Diseases**, v.18, p. 236–243, 2012.

O'BRIEN, P. J.; SMITH, D. E. C.; KNECHTEL, T. J; MARCHAK, A. J.; PRUIMBOOM-BREES, I.; BREES, D. J.; SPRATT, D. P.; ARCHER, F. J.; BUTLER, J.; POTTER, A. N.; PROVOST, J. P.; RICHARD, J.; SNYDER, P. A.; REAGAN, W. J. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. **Laboratory Animals**, v.40, p.153–171, 2006.

OGAWA, Y.; ITOH, H.; TAMURA, N.; SUGA, S.; YOSHIMASA, T.; UEHIRA, M.; MATSUDA, S.; SHIONO, S. NISHIMOTO, H.; NAKAO, K. Molecular Cloning of the Complementary DNA and Gene That Encode Mouse Brain Natriuretic Peptide and Generation of Transgenic Mice That Overexpress the Brain Natriuretic Peptide Gene. **J. Clin. Invest.** v. 93, p.1911-1921, 1994.

PANAGOPOULOU, V.; DEFTEREOS, S.; KOSSYVAKIS, C.; RAISAKIS, K.; GIANNOPOULOS, G.; BOURAS, G.; PYRGAKIS, V.; CLEMAN, M.W. NTproBNP: an important biomarker in cardiac diseases. **Curr Top Med Chem**, v.13(2), p.82-94, 2013.

PARSA, A. F. Z.; ABDOLAH, A.; MAHDAVIMAZDEH, M. Is cardiac biomarkers and left ventricular function affected by chronic kidney disease?. **Indian heart journal**, v. 64, p. 479-483, 2012.

PERAZELLA, M. A; KHAN, S. Increased Mortality in Chronic Kidney Disease: A Call to Action. **Am J Med Sci**, v. 331(3), p.150–153, 2006.

RAJ, D.S.C.; CARRERO, J.J.; SHAH, V. O. ; QURESHI, A. R.; BARANY, P.; HEIMBÜRGER, O.; LINDHOLM, B.; FERGUSON, J.; MOSELEY, P.L.; STENVINKEL, P. Soluble CD14 Levels, Interleukin 6, and Mortality Among Prevalent Hemodialysis Patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 54, (6), p. 1072-1080, 2009.

REMUZZI, G.; BENIGNI, A.; REMUZZI, A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. **J Clin Invest**, v. 116, p. 288–296, 2006.

RITZ, E. Intestinal-renal syndrome: mirage or reality? **Blood Purif.** v. 31, p. 70–76, 2011.

RODRIGUEZ-CAPOTE, K.; BALION, C. M.; HILL, S. A.; CLEVE, R.; YANG, L.; EL SHARIF, A. Utility of Urine Myoglobin for the Prediction of Acute Renal Failure in Patients with Suspected Rhabdomyolysis: A Systematic Review. **Clinical Chemistry**, v. 55(12), p.2190–2197, 2009.

RONCO, C.; HAAPIO, M.; HOUSE, A. A.; ANAVEKAR, N.; BELLOMO, R. Cardiorenal Syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52 (19), p. 1527–1539, 2008.

ROUBICEK, T.; BARTLOVA, M.; KRAJICKOVA, J.; HALUZIKOVA, D.; MRAZ, M.; LACINOVA, Z.; KUDLA, M.; TEPLAN, V.; HALUZIK, M. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. **Nutrition**, v. 25, p. 762–768, 2009.

SATO, Y. Diagnostic and prognostic property of NT-proBNP in patients with renal dysfunction. **Journal of Cardiology**, v. 61, p. 446–447, 2013.

SAWADA, Y.; SUDA, M. YOKOYAMA, H.; KANDA, T.; SAKAMAKI, T.; TANAKAI, S.; NAGAI, R.; ABE, S.; TAKEUCHI, T. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. **J Biol Chem**, v. 272 (20), p. 20545 – 20554. 1997.

SHLIPAK, M.G.; DAY, E. Biomarkers for incident CKD: a new framework for interpreting the literature. **Nat. Rev. Nephrol.** v.9, p. 478–483, 2013

SINGH, G.; BAWEJA, P.S. Creatine kinase-MB: the journey to obsolescence. **Am J Clin Pathol**, v. 141(3), p.415–419, 2014.

SONG, J.; MENG, L.; LI, S.; QU, L.; LI, X. A combination of Chinese herbs, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Angelica sinensis*, improved renal microvascular insufficiency in 5/6 nephrectomized rats. **Vascul Pharmacol**, v.50, p.185–193, 2009.

SUGA, S.; NAKAO, K.; HOSODA, K.; MUKOYAMA, M.; OGAWA, Y.; SHIRAKAMI, G. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic

peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. **Endocrinology**, v. 130, p.229 –239, 1992.

SUDOH, T.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; MATSUO, H. A new natriuretic peptide in porcine brain. **Nature**, v.332, p.78 –81, 1988.

SUMIDA, H.; YASUE, H.; YOSHIMURA, M.; OKUMURA, K. OGAWA, H.; KUGIYAMA, K.; MATSUYAMA, K.; KIKUTA, K.; MORITA, E.; KAZUWA, N. Comparison of secretion pattern between A-type and B-type natriuretic peptides in patients with old myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 25, p.1105 –1110, 1995.

TAKASE, O.; IWABUCHI, K.; QUIGG, R. J. Immunoregulation of Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p.1-2, 2014.

TAMURA, N.; OGAWA, Y.; CHUSHO, H.; NAKAMURA, K.; NAKAO, K.; SUDA, M.; KASAHARA, M.; HASHIMOTO, R.; KATSUURA, G.; MUKOYAMA, M.; ITOH, H.; SAITO, Y.; TANAKA, I.; OTANI, H.; KATSUKI, M.; NAKAO, K. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, 4239 –4244, 2000.

TANG, Z.; JI, D.; LI, L.; FUKUI, M.; TOMINO, Y.; KOIDE, H. Effect of probucol on mRNA expression of glomerular antioxidant enzymes in rat with subtotal nephrectomy. **Chin Med J**, v.109(10), p. 780-786, 1996.

TOTA-MAHARAJ, R.; PERERA, B.; MURRAY, J.; PETRINI, J.; KELLER, A. M. Impact of Troponin Testing in Noncardiac Admissions. **Critical Pathways in Cardiology**, v.13(4), p. 147-151, 2014.

ULRIKE, B. HENDGEN-COTTA; KELM, M.; RASSAF, T. Myoglobin functions in the heart. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 252–259, 2014.

U.S. Renal Data System. **USRDS 2007 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States**. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007.



VAZIRI, N.D.; DURE-SMITH, B.; MILLER, R.; MIRAHMADI, M.K. Pathology of gastrointestinal tract in chronic hemodialysis patients: an autopsy study of 78 cases. **Am J Gastroenterol.** v.80 (8), p.608-611, 1985.

VAZIRI, N. D. CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** v. 21(6), p. 587–592, 2012.

WANG, W.; GIEBISCH, G. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. **Eur J Physiol,** v.458, p.157–168, 2009.

WU-WONG, J.R.; LI, X.; CHEN, Y.W. Different vitamin D receptor agonists exhibit differential effects on endothelial function and aortic gene expression in 5/6 nephrectomized rats. **J Steroid Biochem Mol Biol.,** v.148, p. 202-209, 2015.

ZHANG, W.; HE, J.; ZHANG, F.; HUANG, C.; WU, Y.; HAN, Y.; ZHANG, W.; ZHAO, Y. Prognostic role of C-reactive protein and Interleukin-6 in dialysis patients: a systematic review and meta-analysis. **J Nephrol.** v. 26(02), p. 243-253, 2013.

ZOU, R.; HE, Y.; LI, Y.; HAN, M.; MA, Z.; LIU, X.; RUI ZENG; SHAO, J.; GUO, Y.; HE, X.; YANG, P.; XU, G.; WANG, C.; YAO, Y. Telmisartan protects 5/6 Nx rats against renal injury by enhancing nNOS-derived NO generation via regulation of PPAR $\gamma$  signaling. **Am J Transl Res,** v.6(5), p.517-527, 2014.

## **ANEXO I**



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Curitiba, 2 de dezembro de 2010.

**PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

**REGISTRO DO PROJETO NO CEUA:** 574 – 2ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:** Caracterização do modelo de cardiopatia urêmica em ratos e avaliação do impacto da espironolactona na estrutura miocárdica

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Roberto Pecoits Filho

**EQUIPE DA PESQUISA:**

Roberto Pecoits Filho

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**CENTRO / CURSO:**

Curso de Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos ( <i>Rattus Novergicus</i> )	Machos	260 g	D	60

O colegiado do CEUA em reunião no dia 02/12/2010, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.





Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

*P. Gaberz Kirschnik*

Prof Peter Gaberz Kirschnik

Coordenador

Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR

